



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

“Factores de patogénesis en *Serratia marcescens*”

Lic. Roberto Emanuel Bruna

Directora: Dra. Eleonora García Véscovi

Rosario, Argentina

2017

“Factores de patogénesis en *Serratia marcescens*”.

Roberto Emanuel Bruna

Licenciado en Biotecnología

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Departamento de Microbiología, Laboratorio de Patogénesis Bacteriana, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre los años 2012 y 2017 bajo la dirección de la Dra. Eleonora García Véscovi.

Dra. Eleonora García Véscovi:

Jurado 1:

Jurado 2:.....

Jurado 3:

Defendida:

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Eleonora García Véscovi, por haberme guiado durante todos estos años con gran dedicación y profesionalismo, por estimular continuamente el pensamiento científico, por las tareas extra-curriculares compartidas, y por haberme dado la oportunidad de realizar una estadía doctoral en el exterior. Gracias por seguir confiando en mí como integrante de su grupo de investigación, y anhelo que la próxima etapa nos encuentre cosechando los frutos del trabajo realizado hasta aquí, y a la vez, encarando nuevos y apasionantes desafíos científicos.

Al Dr. Fernando Soncini, por contar siempre con la mejor predisposición para participar y aconsejar durante las discusiones científicas; y también por sus variadas anécdotas que, aunque se repitan a lo largo de los años, el público se renueva y siempre contribuyen a distender el clima de trabajo.

Al Dr. Javier Mariscotti, por ser una fuente permanente de consulta en la mesada del laboratorio, por sus innumerables consejos. A la Dras. Susana Checa y María G. Mediavilla, por sus contribuciones y sugerencias durante los seminarios científicos.

Al Dr. Dominique Ferrandon, por abrirme las puertas de su laboratorio en el IBMC. Gracias por su gran cordialidad, sus consejos, y por tratarme como un integrante más de su grupo de trabajo.

A mis excelentes compañeros del laboratorio 7, tanto los antiguos como los actuales, y con mucho de los cuales he entablado hermosos lazos de amistad. ¡Gracias por todos los buenos momentos, charlas, consejos, mates y risas! Agradezco especialmente a aquellos que hayan colaborado experimentalmente –en mayor o menor medida- con esta Tesis. También quiero mencionar al resto de los colegas del segundo piso del IBR, en especial a los vecinos del laboratorio 8, por su amistad y buena predisposición a ayudar siempre.

I would also like to thank all the people I met during my stay in France. For treating me so nicely, and for all the help provided inside and outside the lab. I was able to work super comfortably at UPR 9022. Thanks to the DF team and all the indian-lebanese “connections”, and specially a word for Bechara and Adrien, for your friendship, for sharing

with me so many hours of exciting Drosophila science but also so much joy, jokes, ping-pong matches, and beers. You almost made me not to miss home!

A todos los grandes amigos que me ha dado la vida en Rosario, especialmente a Ber, Buby y Gasti. Por todos los momentos compartidos dentro y fuera del lab, todas las charlas profundas, su ayuda desinteresada, sus consejos, las risas, partidos de paddle y fútbol, y tanto más. ¡Infinitas gracias, muchachos!

A todos mis amigos nicoleños que, a pesar de la distancia, siempre están.

A mis padres, María del Carmen y Roberto, porque siempre se han esforzado por darme lo mejor y han sido el impulso que he necesitado para salir adelante. Sin su amor y apoyo no hubiera llegado hasta acá. Los quiero muchísimo. A mis hermanos, Leonardo y Enzo, por su cariño y compañía. A mis abuelos Gina, Teresa, y Vicente. Y a todo el resto de mis familiares y a mi familia política.

Y finalmente a mi amor, a Clari, por haber transitado junto a mí toda esta etapa, por haber soportado mi ausencia cuando estuve en el exterior, por brindarme permanentemente todo su amor, su apoyo y contención.

“When you make the finding yourself

- even if you're the last person on Earth to see the light –

you'll never forget it”

Carl Sagan

Parte de los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis han sido publicados en las siguientes revistas y reuniones científicas.

Trabajos publicados:

Hover T, Maya T, Ron S, Sandovsky H, Shadkchan Y, Kijner N, Mitiagin Y, Fichtman B, Harel A, Shanks RM, **Bruna RE**, García Vescovi E, Osherov N. "Mechanisms of Bacterial (*Serratia marcescens*) Attachment to, Migration along, and Killing of Fungal Hyphae". 2016. Appl Environ Microbiol. 82(9):2585-94. doi: 10.1128/AEM.04070-15

Bruna RE, Revale S, García Vescovi E, Mariscotti JF. "Draft Whole-Genome Sequence of *Serratia marcescens* Strain RM66262, Isolated from a Patient with a Urinary Tract Infection". 2015. Genome Announcements. 3:e01423–15.

Presentaciones a reuniones científicas:

Bruna RE, Sina Rahme B, Di Venanzio G, Ferrandon D, García Vescovi E: "Vesículas de membrana externa de *S. marcescens*: virulencia y roles inmunomodulatorios en el insecto modelo *D. melanogaster*". 2016. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, XIV Congreso Argentino de Microbiología ALAM-SAMIGE-AAM.

Bruna RE, Lestradet M, Ferrandon D, García Vescovi E. Comunicación oral: "Outer Membrane Vesicles in *Serratia*: Proteomic Analysis and Deleterious Effect in an Insect Model". 2014. L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL Vol.38 - Suppl. 2

Bruna RE, Mariscotti JF, García Vescovi E. "Transcriptional regulation analysis of PrtA metalloprotease and LipBCD transporter in *Serratia marcescens*". 2014. L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL Vol.38 - Suppl. 2

Di Venanzio G, Lestradet M, **Bruna RE**, García Vescovi E. "The PhoP/PhoQ System and *mgtEs* genes role in *Serratia marcescens*". 2014. L Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. BIOCELL Vol.38 - Suppl. 2

Bruna RE, Mariscotti JF, García Vescovi E. Comunicación oral: "Outer Membrane Vesicles in *Serratia marcescens*". 2013. IX Congreso de Microbiología General, SAMIGE.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	5
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	9
I.1. <i>Serratia marcescens</i>	9
I.1.1- El género <i>Serratia</i>	9
I.1.2. Antecedentes históricos de <i>Serratia marcescens</i>	9
I.1.3. <i>Serratia marcescens</i> y su patogenia	10
I.1.4. Factores de virulencia	12
I.1.4.1. Prodigiosina	12
I.1.4.2. Resistencia antibiótica	13
I.1.4.3. Detección de densidad celular (<i>quorum sensing</i>)	13
I.1.4.4. Flagelo	14
I.1.4.5. Motilidad dependiente de flagelo y biosurfactantes	15
I.1.4.6. Biopelículas	16
I.1.4.7. El secretoma Lip	17
I.1.4.8. Otras exoproteínas	20
I.2. Vesículas de membrana externa	22
I.2.1. Biogénesis de OMVs	23
I.2.2. Carga proteica de las OMVs	26
I.2.3. Funciones de las OMVs en patogénesis	27
I.2.3.1. Transporte de factores de virulencia	27
I.2.3.2. Resistencia a compuestos antimicrobianos	30
I.2.3.3. Interacción de las vesículas con las células hospedadoras	31
I.2.3.4. Adherencia de las vesículas a las células hospedadoras	32
I.2.3.5. Internalización de las vesículas en las células hospedadoras	32
I.2.3.6. Interacción de las OMVs con el sistema inmune innato	34
I.2.3.7. Interacción de las OMVs con el sistema inmune adaptativo	35
I.2.4. Funciones de las OMVs en la fisiología bacteriana	35
I.2.4.1. OMVs en la respuesta a estrés	36
I.2.4.2. OMVs en comunidades bacterianas	37
I.2.5. Aplicaciones tecnológicas de las OMVs	38
I.2.6. Vesículas de membrana en otras bacterias	39
I.3. Sistemas de dos componentes	40
I.3.1. Generalidades	40
I.3.2. El sistema CpxRA	42
I.4. <i>Drosophila melanogaster</i>	47
I.4.1. Modelo de estudio	47
I.4.2. Inmunidad	48
I.4.2.1. La respuesta inmune sistémica	49
I.4.2.2. La respuesta inmune celular	54
I.4.2.3. La respuesta inmune epitelial	55
II. OBJETIVOS	58
III. MATERIALES Y MÉTODOS	60
III.1. Cepas bacterianas, líneas celulares, plásmidos y oligonucleótidos	60
III.2. Medios de cultivo	66
III.2.1. Medios de cultivo bacterianos y antibióticos	66

III.2.2. Medios de cultivo celular	66
III.2.3. Medios de crecimiento de <i>D. melanogaster</i>	66
III.3. Técnicas moleculares de ácidos nucleicos	67
III.3.1. Preparación de ADN cromosomal	67
III.3.2. Preparación de ADN bacteriano plasmídico	68
III.3.3. Preparación de ARN	68
III.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69
III.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)	70
III.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR)	70
III.3.7. Mutagénesis dirigida mediante la técnica de SOE-PCR	71
III.3.8. Adenilación terminal sobre fragmentos de ADN romos	72
III.3.9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	73
III.3.10. Purificación de fragmentos de ADN	73
III.3.11. Digestión de ADN con enzimas de restricción	73
III.3.12. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN	74
III.3.13. Construcciones de plásmidos de expresión y reporteros	74
III.3.14. Servicios de secuenciación de ADN	75
III.4. Preparación de células competentes	75
III.5. Transformación de células competentes y selección de transformantes	76
III.6. Conjugación bipartita	76
III.7. Conjugación tripartita	77
III.8. Manipulación genética	77
III.8.1. Construcción de cepas mutantes en <i>Sma</i> RM66626 por inserción del vector suicida pKNOCK	77
III.8.2. Construcción de cepas etiquetadas en <i>prtA</i> por inserción del vector suicida pKNOCK en <i>Sma</i> RM66626	80
III.8.3. Construcción de las cepas <i>ompA</i> y <i>ompA::4-Cys</i> en <i>Sma</i> RM66626 mediante la utilización del vector suicida pKNG101	81
III.8.4. Construcción de la cepa mutante <i>prtA</i> en <i>Sma</i> DB10 por inserción del vector suicida pKNG101	82
III.9. Análisis de actividad proteolítica secretada	83
III.9.1. Análisis cualitativo o semi-cuantitativo en medio sólido	83
III.9.2. Análisis cuantitativo en medio líquido	84
III.10. Curvas de crecimiento bacteriano y de fluorescencia	84
III.11. Técnicas bioquímicas y moleculares de proteínas	85
III.11.1. Preparación de extractos extracelulares de <i>Sma</i>	85
III.11.2. Preparación de extractos totales de <i>Sma</i>	85
III.11.3. Preparación de membrana externa de <i>Sma</i>	85
III.11.4. Determinación de la concentración de proteínas	86
III.11.5. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	86
III.11.6. Tinción y visualización de geles con azul de Coomassie o nitrato de plata	86
III.11.7. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (<i>Western blot</i>)	87
III.12. Expresión y purificación de la proteína CpxR de fusión a cola de histidina	87
III.13. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína	88

III.13.1. Fosforilación de oligonucleótidos	88
III.13.2. Ensayos de retardo electroforético del ADN	88
III.13.3. Ensayo de protección de la ADNasa I (huella digital o <i>footprinting</i>)	89
III.13.4. Secuenciación de ADN	90
III.14. Vesículas de membrana externa (OMVs)	90
III.14.1. Aislamiento y purificación de OMVs	90
III.14.2. Cuantificación de OMVs	92
III.14.3. Microscopía electrónica transmisión (TEM) de OMVs	93
III.15. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tandem (LC-MS/MS)	93
III.16. Técnicas de tinción con FIAsh	94
III.16.1. Tinción de extractos proteicos totales	94
III.16.2. Tinción de suspensiones bacterianas	94
III.16.3. Tinción de vesículas de membrana externa	94
III.17. Técnicas de cultivos celulares	95
III.17.1. Ensayos de co-incubación de células epiteliales con OMVs	95
III.17.2. Ensayos de co-incubación de células epiteliales con OMVs marcadas fluorescentemente	96
III.18. Técnicas de <i>Drosophila melanogaster</i>	96
III.18.1. Ensayos de microinyección de OMVs	96
III.18.2. Ensayos de extracción de hemolinfa	97
III.18.3. Ensayos de silenciamiento génico	97
III.19. Análisis bioinformáticos	97
III.19.1. Predicción de la localización subcelular y función de las proteínas vesiculares.	97
III.19.2. Predicción del sitio de unión para CpxR en la región promotora de <i>prtA</i> .	98
IV. VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA EN <i>SERRATIA MARCESCENS</i>	101
IV.1. Puesta a punto de una metodología optimizada de purificación de OMVs	102
IV.2. Análisis proteómico de OMVs	107
IV.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión de OMVs	116
IV.4. Estudio de la virulencia de OMVs sobre células CHO	117
IV.4.1. Efecto citotóxico dependiente de serralisina PrtA	117
IV.4.2. Internalización de las OMVs	122
IV.5. Estudio de la virulencia de OMVs en <i>Drosophila melanogaster</i>	123
IV.5.1. Efecto deletéreo de las OMVs dependiente de serralisina PrtA	124
IV.5.2. Modulación de la respuesta inmune sistémica en respuesta a OMVs	126
IV.5.3. Desregulación de la homeostasis de ROS provocada por OMVs	131
IV.6. Diseño, construcción y prueba de concepto de una cepa etiquetada en OMVs	135
CONCLUSIONES	142
V. EXPRESIÓN Y REGULACIÓN DE PROTEASAS SECRETADAS EN <i>SERRATIA MARCESCENS</i>	145
V.1. Identificación <i>in silico</i> de genes codificantes para metaloproteasas en el aislamiento <i>Sma</i> RM66262	146

V.2. Expresión nativa de <i>prtA</i> , <i>slpB</i> , <i>slpC</i> y <i>slpE</i> _____	149
V.3. La serralisina PrtA es la proteasa de mayor expresión y es secretada a través del sistema LipBCD _____	150
V.4. La modificación del extremo C-terminal de PrtA altera su secreción _____	152
V.5. La temperatura de crecimiento es una señal moduladora para la expresión de PrtA _____	157
V.6. Búsqueda de factores termorregulatorios para PrtA _____	162
V.7. CpxR regula a nivel transcripcional la expresión de <i>prtA</i> _____	165
V.8. Determinación de la interacción de CpxR con la región promotora de <i>prtA</i> _____	166
V.9. El nivel de actividad del sistema CpxRA depende de la temperatura de crecimiento bacteriano _____	169
V.10. Señales inductoras del sistema CpxRA modulan la expresión de PrtA _____	170
V.11. La osmolaridad es una señal moduladora de la expresión de <i>prtA</i> _____	173
V.12. El hierro como señal moduladora de la expresión de la actividad proteolítica en <i>Serratia</i> _____	175
CONCLUSIONES _____	183
VI. RESUMEN _____	185
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	187

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs ₂₆₀	absorbancia a 260 nanómetros
Abs ₂₈₀	absorbancia a 280 nanómetros
Abs ₃₄₀	absorbancia a 280 nanómetros
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
AMPc	adenosina monofosfato cíclica
Amp ^R	resistente a ampicilina
AMPs	péptidos antimicrobianos
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNi	ARN de interferencia
ATP	adenosina 5'-trifosfato
ATPasa	adenosina 5'-trifosfato hidrolasa
BCIP	5-bromo, 4-cloro, 3-indolfosfato
BSA	albúmina sérica bovina
CHO	células de ovario de hámster chino
Ci	Curie
Cm ^R	resistente a cloranfenicol
DAP	ácido diaminopimélico
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
DO ₆₀₀	densidad óptica a 600 nanómetros
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GFP	proteína verde fluorescente
h	hora(s)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
His	histidina

HQ	histidina quinasa
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
JNK	quinasa c-Jun N-terminal
Km ^R	resistente a kanamicina
pb	pares de bases
LB	Luria Bertani
LC-MS/MS	cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa
LPS	lipopolisacárido
mA	miliamperios
MAPK	proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKKK	MAP quinasa quinasa quinasa
ME	membrana externa
min	minuto(s)
MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MOPS	ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
NAC	N-acetilcisteína
NBT	azul de nitrotetrazolio
nt	nucleótido
OMVs	vesículas de membrana externa
p.i.	post inyección
p/v	peso/volumen
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PG	peptidoglicano
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
qPCR	PCR cuantitativa
RT-PCR	retro-transcriptasa PCR
ROS	especies reactivas del oxígeno
RR	regulador respuesta

SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	suero fetal bovino
<i>Sma</i>	<i>Serratia marcescens</i>
SPI	isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i>
SSPs	proteínas secretadas solubles
SST (I-VI)	sistema de secreción tipo (I-VI)
TCA	ácido tricloroacético
Tc ^R	resistente a tetraciclina
TLR	receptor tipo Toll
Tris	N-tris-(hidroximetil) aminometano
TBE	buffer Tris-borato-EDTA
TBS	buffer Tris salino
TCS	sistema de dos componentes
TE	buffer Tris-EDTA
U	unidad enzimática
UV	ultravioleta
v/v	volumen/volumen
X g	fuerza centrífuga

IDIOMA EXTRANJERO

<i>buffer</i>	solución reguladora
<i>salting out</i>	precipitación salina

INTRODUCCIÓN GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. *Serratia marcescens*

I.1.1- El género *Serratia*

El género *Serratia* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros del género son bacilos Gram negativos, de 0,5-0,8 µm de diámetro y 0,9-2,0 µm de longitud, anaerobios facultativos, móviles, de flagelación peritrica. Presentan metabolismos respiratorios y fermentativos (1) . Existen 14 especies y 2 subespecies reconocidas en el género, *S. entomophila*, *S. ficaria*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *Sma* subsp. *marcescens*, *Sma* subsp. *sakuensis*, *S. nematodiphila*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea*, *S. ureilytica* (2). Cepas de *Serratia* pueden ser aisladas de diversos nichos ambientales: suelo, agua, y aire. Pueden actuar como patógenos con un rango de hospedador muy amplio, siendo capaces de infectar plantas, invertebrados y vertebrados. La ubicuidad de *Serratia* se atribuye principalmente a un conjunto de rasgos característicos del género: la secreción de potentes enzimas líticas es relevante para la colonización de nichos medioambientales, la adquisición de nutrientes, y la destrucción de competidores; la presencia de múltiples resistencias a antibióticos; motilidades tipo *swimming* o *swarming*; la producción de metabolitos secundarios (como prodigiosina en las cepas pigmentadas, o biosurfactantes); y la capacidad de presentar comportamientos comunitarios, como el *quorum sensing* y la producción de biopelículas (3, 4). *Serratia spp.* rara vez son la causa de las infecciones primarias en los seres humanos. En cambio, son patógenos oportunistas que representan una amenaza para pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos.

I.1.2. Antecedentes históricos de *Serratia marcescens*

Serratia marcescens (*Sma*) es la especie más estudiada del género. Fue descubierta en 1819 por el farmacéutico Bartolomeo Bizio, quién estudiaba el fenómeno de enrojecimiento de polenta en la ciudad de Padua, Italia. La denominó *Serratia* en honor a Seferino Serrati, un físico reconocido de la época. Como el pigmento decaía rápidamente y el alimento se descomponía, Bizio agregó al nombre de su microorganismo el epíteto *marcescens* que proviene del latín “decaer, descomponer” (5, 6). Originalmente, *Sma* era considerada un organismo saprófito inocuo, no patogénico y usualmente usada como marcador biológico para estudiar la diseminación de microorganismos debido a sus colonias rojas fácilmente identificables

(3). Luego de la revisión de una serie de incidentes, en 1896, el Prof. Scheurlen de la Universidad de Estrasburgo demostró que *Serratia* era el agente causal de gran número de muertes. Entre 1950 y 1966, *Sma* fue utilizada como un simulador de pruebas de armas biológicas por los militares de EE.UU. Cultivos de *Serratia* fueron aerosolizados sobre una población que desconocía el experimento al que estaba siendo sometida. A los pocos días de la diseminación, se comenzaron a reportar brotes de infecciones causadas por *Serratia marcescens* (7). Desde 1960, la incidencia de esta bacteria en infecciones humanas se ha incrementado, registrándose el surgimiento de numerosas cepas resistentes a múltiples antibióticos.

I.1.3. *Serratia marcescens* y su patogenicia

En humanos, *Sma* se clasifica como un patógeno oportunista, siendo uno de los principales microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en unidades de terapia intensiva y de cuidados neonatales, las cuales son importantes debido a su alta mortalidad y costo, que son aún mayores cuando adquieren un carácter epidémico (8, 9). El 97% de los aislamientos clínicos del género *Serratia* corresponde a la especie *Serratia marcescens*, siendo escasos los reportes de infecciones causadas por los demás miembros del género (1).

Se ha comprobado que *Sma*, así como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, y *Shigella* spp., es capaz de sobrevivir en superficies inanimadas por el término de meses, factor que favorece su permanencia y diseminación (10). Además, *Sma* se adhiere fácilmente a instrumental hospitalario, catéteres, endoscopios y tubos intravenosos, siendo elevada su resistencia a los procedimientos de esterilización y a protocolos convencionales de desinfección (11). Se la ha encontrado también en comidas, particularmente en preparaciones con alto contenido de almidón, lo que le provee un excelente ambiente de crecimiento.

En humanos, luego de ingresar en el hospedador, *Sma* puede infectar numerosos sitios, incluidos los epitelios urinario (12) y respiratorio (13), los músculos y el tejido subcutáneo (14), los riñones (12), los pulmones (15) y también el corazón y pericardio (16). Asimismo, son comunes las infecciones oculares -no necesariamente en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos- producidas por *Sma*, siendo una causa frecuentes de queratitis (17). En general, las infecciones causadas por *Sma* inducen inflamación y fiebre, pero se puede desarrollar bacteriemia fatal en pacientes debilitados por infecciones previas, cirugía o inmunosupresión. A pesar de haberse identificado diversos factores de virulencia potenciales producidos por *Sma*, son

escasas las publicaciones donde se explora en profundidad los mecanismos que utiliza para invadir, sobrevivir y proliferar dentro del hospedador.

Hertle y Schwartz reportaron que *Sma* es capaz de invadir distintas líneas celulares epiteliales, por un mecanismo dependiente de la adhesión mediada por fimbrias, y de la producción de hemolisina. Propusieron que dicha toxina facilitaría la internalización de la bacteria, pero no estaría involucrada en la replicación intracelular (18). En un reporte más reciente se demostró que distintos aislamientos clínicos no pigmentados de *Sma* eran citotóxicos ante distintas líneas celulares epiteliales y de macrófagos, y que esta citotoxicidad era dependiente del contacto entre las bacterias y las células eucariotas. Además, se reportó que *Serratia* era capaz de inducir necrosis y apoptosis dependiente de caspasas en estas líneas celulares (19).

En nuestro laboratorio, examinando los mecanismos que el patógeno despliega para invadir el organismo hospedador, nuestro grupo de trabajo determinó que *Sma* no sólo es capaz de invadir células no fagocíticas, sino también de persistir y replicarse en el interior de compartimentos con características autofágicas, que se denominaron SeCV (vacuola que contiene a *Serratia*) (20). La autofagia es el proceso celular durante el cual regiones del citoplasma, como así también constituyentes celulares deteriorados, son capturados en estructuras de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales son formados a través de la elongación y cierre de vesículas llamadas fagóforos. Normalmente, los autofagosomas se fusionan con lisosomas para dar origen a los autolisosomas, donde el material capturado es sometido a degradación hidrolítica en medio ácido. La autofagia juega un rol clave en la degradación de organelas dañadas, proteínas mal plegadas u otros contenidos citosólicos potencialmente tóxicos, como lo son los patógenos. Según el modelo desarrollado en el laboratorio, *Serratia* requiere de la expresión flagelar para adherirse a la célula epitelial y expresa la hemolisina ShIA, induciendo el proceso de autofagia desde el espacio extracelular. Luego, el patógeno ingresa a la célula hospedadora contenido en una vacuola con características de endosoma o fagosoma temprano, que rápidamente adquiere marcadores autofagosomales (Rab7 y LC3) (21). Una población mayoritaria de las bacterias intracelulares se replica rápidamente y, mediante la intervención de ShIA y de genes regulados por el sistema PhoP/PhoQ (22) (en conjunción con otros potenciales factores bacterianos aún no caracterizados) se produce un bloqueo de la fusión con lisosomas. Mientras que otra población minoritaria del microorganismo, no es capaz de escapar al mecanismo de defensa del hospedador y es degradado en compartimientos lisosomales. Como resultado, *Sma* sería capaz de subvertir el proceso de autofagia celular, encontrando en los

autofagosomas un nicho adecuado para su replicación intracelular. Posteriormente, nuestro grupo de trabajo demostró que ShIA también comanda el escape de *Serratia* a partir de las células invadidas. La toxina induce una movilización del Ca^{2+} intracelular que remodela el citoesqueleto de actina y facilita el egreso de las SeCVs, en un proceso exocítico no lítico (23).

También se ha demostrado la capacidad de esta enterobacteria para invadir un amplio rango de hospedadores, tales como el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. En *C. elegans*, se corroboró que los genes implicados en la biosíntesis de LPS, la captación de hierro y la producción de hemolisina son necesarios para la virulencia de *Serratia in vivo* (24). *Serratia* es capaz de invadir células epiteliales del intestino medio de *D. melanogaster* al atravesar el intestino del insecto para llegar a la cavidad corporal, haciendo frente a la respuesta inmune sistémica del insecto, como se discute más adelante (25).

I.1.4. Factores de virulencia

Las bacterias patógenas a lo largo de la evolución han adquirido características que les permiten invadir el ambiente del hospedador, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión, permanecer en estos sitios a través de procesos de colonización, evadir al sistema inmune y finalmente causar daño tisular con el fin de lograr acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Por lo tanto, un factor o determinante de virulencia es un componente microbiano que favorece el crecimiento o supervivencia durante la infección. Generalmente, la patogénesis de una bacteria es un proceso multifactorial que requiere la acción coordinada de estos factores (26).

En *Sma*, se han identificado numerosos factores de virulencia. Sin embargo, el rol y la preponderancia de muchos de ellos no han sido totalmente dilucidados ya que, como expresamos anteriormente, no se conocen en profundidad los mecanismos de invasión que utiliza esta bacteria.

I.1.4.1. Prodigiosina

Sma puede producir prodigiosina (2-metil-3-amil-6-metoxi-5-(2-pirril)-2,2'-dipirrilmeteno), pigmento rojizo no difusible, insoluble en agua, unido a la envoltura celular. Constituye un metabolito secundario típico, siendo producido sólo en etapas tardías del crecimiento bacteriano y bajo condiciones aeróbicas. Se ha reportado que presenta actividad antimicrobiana, antifúngica, antiprotazo, inmunosupresora y

anticancerígena (27). El pigmento no tiene rol fisiológico definido, se supone que podría actuar como mecanismo protector en condiciones desfavorable. Las cepas pigmentadas son comúnmente aquellas aisladas de medios naturales, mientras que la mayoría de las cepas provenientes de aislamientos clínicos son no pigmentadas y sus colonias presentan un color blanco-amarillo (4).

I.1.4.2. Resistencia antibiótica

La incidencia de infecciones ocasionadas por *Serratia* se ha visto incrementada en los últimos años, y es esencialmente atribuida a la adquisición de mecanismos de resistencia a antibióticos múltiples. Se han reportado resistencias a compuestos β -lactámicos, cefalosporinas, aminoglicósidos y fluoroquinolonas que complican el tratamiento de las infecciones nosocomiales causadas por *Sma* (28).

La resistencia a antibióticos β -lactámicos viene dada por dos mecanismos: la expresión de β -lactamasas activas capaces de degradar antibióticos de la familia de las cefalosporinas, carbapenemes y penicilinas, como ser β -lactamasas de amplio espectro y metalo- β -lactamasas (29–31); y por otro lado, una menor permeabilidad de la membrana debido a modificaciones en el antígeno O de su LPS (3).

La inactivación de los antibióticos aminoglicósidos tales como gentamicina, estreptomycin y ampicilina se da por la expresión en muchas cepas de *Serratia* de adenil- y acetil-transferasas (32, 33). Generalmente, estas enzimas se expresan desde plásmidos que se transfieren por conjugación a otras cepas y permiten la diseminación de la resistencia bacteriana, aumentando la incidencia de infecciones causadas por *Serratia*.

La resistencia a fluoroquinolonas (inhibidoras de la ADN girasa bacteriana) se basa en dos mecanismos descritos para *Serratia*: presencia de mutaciones específicas en la ADN girasa que reducen su susceptibilidad a las fluoroquinolonas; y por otro lado, bombas de eflujo específicas para ciprofloxacina y oxofloxacina, responsables de evitar la acumulación de la fluoroquinolona en el interior de la bacteria (34–36).

I.1.4.3. Detección de densidad celular (*quorum sensing*)

Se conoce como *quorum sensing* al proceso por el cual las bacterias detectan su densidad poblacional y utilizan esta información en pos de regular coordinadamente la expresión de diferentes genes logrando adaptarse a diversas condiciones ambientales. Los microorganismos son capaces de producir moléculas señales que se acumulan

conforme la población aumenta, y al exceder la señal un valor umbral de concentración se activa la expresión de diversos genes. De esta manera, se modulan los procesos fisiológicos de forma concertada a través de toda la población (37). Diversas especies bacterianas regulan mediante *quorum sensing* un amplio espectro de procesos importantes: virulencia, producción de metabolitos secundarios, simbiosis, esporulación y formación de biopelículas.

En bacterias Gram negativas, las señales de *quorum sensing* más comunes son las N-acil homoserin lactonas (aHSL), detectadas por mecanismos del tipo LuxIR. La aHSL es sintetizada mediante una sintetasa LuxI y la proteína LuxR es el regulador transcripcional que, luego de su activación por aHSL, es capaz de inducir o reprimir los genes dependientes de este sistema (37). En *Sma* se han descrito dos sistemas de *quorum sensing* del tipo LuxIR. SwrI (homologo a LuxI) dirige la síntesis N-butanoil-L-homoserin lactona (C4-HSL) y N-hexanoil-L-homoserin lactona (C6-HSL), las cuales a través de SwrR inducen la producción de exoproteínas y biosurfactante, motilidad tipo *swarming* y la formación de biopelículas (38–41). Por su parte, el sistema SpnIR actúa para derreprimir la síntesis de biosurfactante y de prodigiosina (42).

Por otro lado, un segundo tipo de sistema presente tanto en Gram negativas como Gram positivas es el del tipo LuxS que utiliza una molécula señal denominada Autoinductor-2 (AI-2). Esta señal, a diferencia de las aHSL, es universal y se postula que puede servir para la comunicación intra e interespecie. LuxS es la proteína responsable de la producción del AI-2 y, en condiciones de alta densidad celular, el autoinductor se une al sensor LuxP iniciando una cascada de desfosforilación que finaliza con la activación del regulador transcripcional LuxR (43). En *Sma* el sistema LuxS/AI-2 está involucrado en la producción de prodigiosina, carbapenemes y hemolisina. La mutante en *luxS* es menos virulenta en el modelo de infección de *C. elegans*, y muestra una mayor producción de biopelículas al comparar con la cepa parental (44).

I.1.4.4. Flagelo

El flagelo es la organela responsable de la locomoción en muchas especies bacterianas. Los flagelos bacterianos está compuestos por: un cuerpo basal, que ancla el flagelo en la envoltura celular bacteriana y contiene el motor que impulsa la rotación flagelar; el gancho, una varilla curvada y flexible que convierte el movimiento rotacional en olas; y un largo filamento helicoidal, que propaga las olas iniciadas por el gancho y propulsa a la bacteria a través del medio líquido en el que se encuentra. Tanto el

filamento como el gancho son estructuras cilíndricas huecas que se extienden desde la superficie celular. A través de ellas, se translocan y autoensamblan en el extremo distal los componentes proteicos del flagelo.

La expresión los más de 50 genes flagelares está regulada en múltiples niveles en respuesta a señales ambientales y señales acopladas al desarrollo morfológico de la organela flagelar, permitiendo que las proteínas flagelares sean producidas en el momento exacto en que son requeridas para ensamblarse en la estructura flagelar (45). Dentro del regulón, los operones están divididos en tres clases de distinta jerarquía transcripcional temporalmente reguladas: clases temprana, media y tardía. El operón del regulador maestro flagelar *flhDC* es el único miembro de la clase temprana de genes. Su expresión responde a numerosas señales globales a través de una serie de reguladores como las proteínas de shock térmico DnaK, DnaJ y GrpE, que responden a cambios en temperatura; OmpR, que responde a osmolaridad; H-NS, que responde a cambios en pH; AMPc-CRP, que responde a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono y el sistema RcsCDB, que responde a estrés de la envoltura celular, entre otros factores, como se describirá más adelante (46). Las proteínas FlhD y FlhC forman un complejo heterotetramérico -FlhC₂FlhD₂ que actúa como activador transcripcional de los operones de clase media. Esta activación es dependiente de la ARN polimerasa asociada a la subunidad $\sigma 70$ (47). Los productos proteicos de los operones de clase media incluyen proteínas necesarias para la estructura y ensamblaje del cuerpo basal, así como también dos reguladores transcripcionales: FliA y su regulador negativo, FlgM. *fliA* codifica para una subunidad σ alternativa de la ARN polimerasa, $\sigma 28$. Esta subunidad confiere especificidad a la ARN polimerasa para los promotores flagelares de los genes tardíos. En nuestro laboratorio, se determinó que, en *Sma*, el regulador RcsB es capaz de inhibir la transcripción del operón maestro *flhDC* y, por lo tanto inhibir la biosíntesis del flagelo (48).

I.1.4.5. Motilidad dependiente de flagelo y biosurfactantes

Sma es capaz de desarrollar dos formas de motilidad mediadas por flagelo, *swimming* y *swarming*, dependiendo de la viscosidad del medio (49). El *swimming* ocurre en medio líquido y es el movimiento individual de la bacteria mediado por flagelo que no involucra procesos de diferenciación celular. Las células presentan sólo uno o dos flagelos polares (50) y se mueven individualmente en forma aparentemente desorganizada, pasando por periodos de nado suave interrumpidos por tumbos cortos (51). En contraposición, el *swarming* ocurre en medio semisólido y está acompañado por diferenciación celular, reflejándose en la aparición de células bacterianas más

largas, multinucleadas, aseptadas e hiperflageladas (49), que se mueven coordinadamente sobre la superficie del agar. El rápido movimiento de las células con motilidad tipo *swarming* en el borde de la colonia, acompañado por crecimiento bacteriano dentro de la colonia, da lugar a una colonización extremadamente rápida (51). En *Sma* la motilidad de tipo *swarming* está sujeta a regulación por temperatura, siendo activada a 30°C y reprimida a 37°C (52). El *swarming* está controlado, principalmente, por dos reguladores maestros: un control dado por el regulador transcripcional FhID₂C₂, el cual regula la biosíntesis completa del flagelo y un control metabólico, ejercido por el sistema de *quorum sensing* SwrIR (38).

Existen varios compuestos extracelulares, como polisacáridos y biosurfactantes, que mediante la reducción de la tensión superficial del medio facilitan la translocación sobre la superficie. Se han identificado tres compuestos con propiedades biosurfactantes en *Sma* denominados serrawettinas W1, W2 y W3, todos ellos con una estructura ciclolipopeptídica similar. Cada cepa es capaz de secretar sólo una de estas especies moleculares, siendo W1 secretada por cepas pigmentadas, mientras que W2 y W3 son producidas por cepas no pigmentadas (53). La producción de serrawettina W2 está controlada por el sistema SwrIR, y mutantes en dicho gen son incapaces de realizar *swarming* (54).

I.1.4.6. Biopelículas

Las biopelículas son comunidades estructuradas de microcolonias bacterianas adheridas a una superficie y embebidas en sustancias exopoliméricas producidas por las mismas bacterias. Estas comunidades bacterianas suelen tener mayor resistencia a agentes antimicrobianos y a los mecanismos de defensa del hospedador (55). Las biopelículas modelos formadas por bacterias como *P. aeruginosa* y *E. coli*, consisten en células no diferenciadas empaquetadas en microcolonias. En cambio, la formación de biopelículas en *Sma* responde a un programa genético en el cual se observa diferenciación celular y estructural; con formación de células filamentosas, agregación de células vegetativas y entrecruzamiento de cadenas celulares durante la maduración del mismo. La formación de estas estructuras es dependiente del sistema de *quorum sensing* SwrIR. Debido a que *Sma* es capaz de adherirse tanto a superficies bióticas como abióticas, y de formar biopelículas sobre catéteres, implantes, lentes de contacto, etc.; este comportamiento comunitario le facilitaría a la bacteria el contacto con los tejidos y su posterior ingreso al hospedador (39).

I.1.4.7. El secretoma Lip

Transportador Lip. Generalidades

Una de las características distintivas de *Serratia marcescens* es su capacidad para secretar gran variedad de enzimas al medio extracelular a través de múltiples mecanismos. En particular, *Serratia* posee un sistema de secreción tipo I (SSTI), denominado Lip, cuyos sustratos son: la lipasa LipA; una proteína de membrana SlaA (o proteína de la capa S); la metaloproteasa PrtA; y SlpB, una segunda metaloproteasa que ha sido recientemente identificada también como parte del secretoma (56). Todas estas proteínas requieren de un motivo C-terminal específico para poder exportarse a través de este sistema (57, 58). El sistema Lip está codificado por el operón *lipBCD* y está constituido por tres proteínas: LipB es la ATPasa de membrana, es decir, pertenece a la familia de transportadores que unen e hidrolizan ATP y está anclada a la membrana interna de la bacteria. LipC es la proteína de fusión de membrana MFP (*m*embrane *f*usión *p*rotein) que permite el pasaje a través de las membranas y evita el contacto de las proteínas exportadas con el periplasma. LipD es una proteína ubicada en la membrana externa (57).

La expresión del transportador Lip, en particular la expresión de *lipB* es dependiente del sistema *quorum sensing* SwrIR. Así, La actividad proteolítica y la expresión extracelular de SlaA está regulada por Swr, a través del sistema Lip. Sin embargo, la actividad lipasa, a pesar de ser secretada por el sistema Lip, no presenta regulación por el sistema Swr. La hipótesis sugerida por Riedel *et al.* es que LipA tendría mayor afinidad que PrtA y que SlaA por el exportador Lip y de esta forma la capacidad limitada de exportación en entornos *swrI*, donde la expresión de la proteína LipB está reprimida, afectaría la secreción de estas dos últimas proteínas pero no la secreción de la lipasa (41).

Lipasa

LipA es una lipasa extracelular, de 62 kDa, clasificada en base a su secuencia nucleotídica como lipasa verdadera perteneciente a la subfamilia I-3 (59). Las lipasas de esta subfamilia se caracterizan por presentar alto peso molecular, sitio activo característico de las serina esterases, actividad dependiente de Ca^{2+} , exporte mediado por SSTI y ausencia de péptido señal N-terminal para su transporte (60, 61).

Proteína de capa S

SlaA es una proteína de superficie, de 100 kDa, localizada en la membrana de *Sma* (62). Estas proteínas son glicoproteínas que se disponen mediante entrecruzamientos oblicuos, tetragonales o hexagonales, formando estructuras cuasi cristalinas, en la membrana externa de las bacterias. Se desconoce cuál es el rol fisiológico de SlaA; sin embargo, en *Campylobacter fetus* se ha reportado que la proteína homóloga de capa S RsaA estaría involucrada en su resistencia al complemento por inhibir la unión de factores séricos específicos (63).

Metaloproteasas PrtA y SlpB

La metaloproteasa PrtA, comúnmente denominada serralisina, es el miembro prototípico de una familia homónima de proteasas, que a la vez pertenecen a la superfamilia de las zinc metaloproteasas (64). Estructuralmente, la serralisina se compone de dos dominios globulares: un dominio proteolítico N-terminal y un dominio C-terminal capaz de unir Ca^{2+} . El dominio N-terminal contiene el motivo canónico HEXXHXXGXXH asociado a la coordinación del Zn^{2+} en este tipo de metaloproteasas, y también posee una homología estructural significativa con otras metaloproteasas, incluyendo aquellas involucradas en el procesamiento de la matriz extracelular en humanos (65, 66). El dominio C-terminal contiene múltiples motivos de unión a Ca^{2+} asociados con la familia RTX (*repeat in toxin*) de factores de virulencia bacterianos (67). Dichos motivos están compuestos por repeticiones de una secuencia nonapeptídica rica en aspartato y glicina. La unión del Ca^{2+} a estos motivos induce su plegamiento así como también el plegamiento y la activación del dominio N-terminal. Este modo de regulación mediada por calcio parece ser no sólo un mecanismo común a la familia de las serralisinas, sino también para la familia RTX de factores de virulencia y toxinas (67, 68). La serralisina se sintetiza como zimógeno, para luego perder un pro-péptido durante el proceso de secreción y activación. La proteína madura tiene un peso de 50,6 kDa (69).

Las especies bacterianas productoras de serralisinas normalmente co-expresan inhibidores que bloquean la función de sus respectivas proteasas en el citosol o el periplasma (70, 71). El inhibidor se une al sitio activo de la proteína a través de la coordinación con el ion Zn^{2+} y contactos proteína-proteína con superficies del dominio catalítico N-terminal (72, 73). Se desconoce la utilidad de la localización periplásmica del inhibidor, debido a que estas enzimas normalmente no se encuentran allí.

La serralisina PrtA de *Serratia* es considerada un importante factor de virulencia. Estudios *in vitro* utilizando señalaron que la misma es capaz de degradar IgG, IgA, y fibronectina, y de producir citotoxicidad en una amplia variedad de tipos celulares (74–76). Además, PrtA fue capaz de inducir respuestas inflamatorias en células escamosas de carcinoma pulmonar humano (EBC-1), induciendo la expresión de IL-6 e IL-8 (77). PrtA fue el factor predominante en modelos de daño corneal utilizando conejos: la serralisina causó queratitis al ser inyectada y promovió la dispersión bacteriana a través del estroma corneal (78).

Molla *et al.* (79) han demostrado que la α 2-macroglobulina, una proteína sérica ampliamente distribuida en mamíferos e implicada en la inhibición de proteasas tanto exógenas como endógenas, es capaz de formar un complejo con PrtA, el cual es luego captado por la célula hospedadora (fibroblasto o macrófago) mediante una endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, se señaló que la serralisina se liberaría de la α 2-macroglobulina, recuperando su actividad proteolítica, y eventualmente causando la desintegración de la estructura intracelular y la muerte de la célula.

Asimismo, PrtA podría degradar proteínas de superficie celular en mamíferos modulando la fisiología celular. En un estudio reciente, se demostró que PrtA es capaz de activar canales epiteliales de sodio en distintos modelos de celulares pulmonares. Dicha activación, podría volver más favorable el ambiente pulmonar para eventos como la adhesión bacteriana y la subsecuente colonización, contribuyendo así a la virulencia de *Sma* (80).

Además, PrtA alteró procesos inmunes celulares utilizando el modelo del gusano de seda *Bombyx mori*. Por un lado, se determinó que -tras la inyección con sobrenadantes de *Serratia*- la serralisina está involucrada en la reducción de la adhesividad de hemocitos circulantes, provocando la supresión de la inmunidad celular. En particular, PrtA degrada BmSPH-1, un factor que media la adhesión de los hemocitos a la superficie tisular (81). Por otro lado, PrtA fue el factor responsable de promover el sangrado de hemolinfa en la larva tras la inyección con extractos extracelulares de *Sma*, inhibiendo el proceso de coagulación de la herida (82).

Las proteasas de la familia de serralisina no son exclusivas de *Serratia*, sino que se han descrito proteasas RTX homólogas en otros seis géneros bacterianos que incluyen a *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Caulobacter*, *Photorhabdus* y *Xenorhabdus* (67). Estas metaloproteasas también fueron señaladas como determinantes de virulencia, principalmente debido a su capacidad para la

degradación de factores inmunes humorales. Por ejemplo, estudios *in vitro* revelaron que ZapA de *P. mirabilis* degrada IgA e IgG, y AprA de *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de hidrolizar fibrina y fibrinógeno (83), y exhibe una actividad anticoagulante en plasma humano (84). También es capaz de escindir laminina, lo que sugiere un rol directo en la invasión de tejidos y en las lesiones hemorrágicas que causa este microorganismo (85). Además, AprA es capaz de degradar moléculas del complemento, lo que facilitaría la supervivencia y la proliferación de *Pseudomonas* en el plasma del organismo hospedador (86). Por su parte, ZapA de *Proteus mirabilis* tiene la capacidad de escindir IgG, IgA, y péptidos antimicrobianos tales como defensina β -1 y LL-37 (87–89); y se ha demostrado que se expresa específicamente durante la diferenciación células *swimmers* a células *swarmers* (90).

Una segunda metaloproteasa de la familia de las serralisinas pero diferente a PrtA, fue recientemente identificada como parte del secretoma Lip en la cepa *Sma* PIC3611. SlpB provoca citotoxicidad sobre una línea celular de carcinoma pulmonar, al ser sobre-expresada. El análisis de perfiles proteicos por SDS-PAGE indica que SlpB se produce a menores niveles que PrtA. Asimismo, ensayos con la proteína purificada *in vitro* demostraron que la proteína provoca citotoxicidad frente células respiratorias y oculares en cultivo. Dicho efecto es calcio-dependiente, y es capaz de ser inhibido por el inhibidor de proteasa AprI, proveniente de *P. aeruginosa* (71, 76).

I.1.4.8. Otras exoproteínas

A continuación, se brinda una síntesis desarrollando las principales características del resto de las exoproteínas descritas de *Serratia*, algunas de las cuales se encuentran bien caracterizadas, como el caso de la hemolisina; sin embargo, el rol y los mecanismos de secreción para otras enzimas (quitinasas, nucleasa, etc) permanecen sin dilucidarse.

Hemolisina

La hemolisina ShIA de *Sma* ha sido extensamente estudiada y es considerada uno de los principales factores de virulencia de esta bacteria. ShIA fue el primer miembro caracterizado de un nuevo grupo de proteínas secretadas por el sistema de dos compañeros o tipo Vb. En el operón *shIAB*, *shIA* codifica para la hemolisina, proteína de 165 kDa; y *shIB* codifica para una proteína de membrana externa de 65 kDa. Ambas proteínas, ShIA y ShIB, se exportan al periplasma mediante un péptido señal N-terminal. Posteriormente, ShIB se inserta en la membrana externa de la bacteria y colabora tanto en la secreción de ShIA como en su activación (91, 92). Se

ha reportado que la activación de ShIA también depende de fosfoetanolamina, un componente principal de la membrana externa de *Sma* (93).

La hemolisina no es literalmente secretada al medio extracelular, ya que puede ejercer su acción unida a la membrana de la bacteria; y produce poros por un mecanismo diferente a las hemolisinas prototípicas (toxinas RTX, α -toxina de *Staphylococcus aureus* y estreptolisina O) (94, 95). Asimismo, se ha reportado que ShIA es requerida para la invasión a diferentes líneas epiteliales; y en dosis sublíticas, induce depleción de ATP y eflujo de K^+ tanto en células epiteliales como en fibroblastos. A concentraciones mayores a las sublíticas, ShIA conduce a la vacuolización del citoplasma y a la lisis celular (94, 95).

Kurz *et al.* (24) identificaron a la hemolisina de *Sma* como un factor de virulencia necesario para la invasión en *C. elegans*, *D. melanogaster* y ratones. Además, en este mismo trabajo se demostró que una cepa mutante en ShIA presentaba menor citotoxicidad ante distintas líneas celulares.

Como se comentó previamente, en nuestro laboratorio, se determinó que la hemolisina es responsable de inducir el proceso autofágico en células CHO desde el medio extracelular, así como también de provocar una movilización de Ca^{2+} con un rearrreglo concomitante de actina en la célula hospedadora que media el escape de las bacterias hacia el medio extracelular (21, 23).

Serina proteasa

Se secreta mediante un sistema de secreción de tipo V (SSTV), también llamado de autotransporte: la proteasa es sintetizada en una forma precursora más larga y luego es convertida en la proteína madura por corte de una secuencia señal N-terminal y una pro-región C-terminal. Esta región C-terminal se integra a la membrana externa y cumple la función de exportar la proteína madura a través de dicha membrana (96, 97).

Quitinasas

Estas enzimas llevan a cabo el paso crítico en la degradación y utilización de quitina, un polímero de unidades de N-acetilglucosamina unidas por uniones β -1,4, como fuente de carbono y energía en bacterias. *Sma* produce al menos tres quitinasas codificadas por los genes *chiA*, *chiB* y *chiC* (98, 99). Asimismo, *Serratia* codifica para una proteína con homología a las llamadas CBPs (por *chitin binding proteins*), las cuales promueven la interacción entre las quitinasas y sus respectivos sustratos, e

incrementan la actividad de dichas enzimas (100). La quitina un componente estructural del exoesqueleto de artrópodos y de la pared celular de hongos, por ende, las quitinasas serían exoenzimas tóxicas para estos organismos.

Fosfolipasa

Mediante la expresión del operón *phlAB*, *Sma* produce una fosfolipasa A (PhIA) y una proteína accesoria (PhIB), que previene la actividad de PhIA dentro de la bacteria (101). Se demostró que PhIA es coexpresada con los genes flagelares, y requiere del flagelo para su exporte (102). Si bien no se ha dilucidado el rol patogénico de esta fosfolipasa, recientemente, se ha reportado que PhIA presenta actividad hemolítica frente a glóbulos rojos y actividad citotóxica sobre células epiteliales. La liberación de lisofosfolípidos, provenientes de la hidrólisis de fosfolípidos originada por PhIA, serían los responsables de desestabilizar las membranas y originar la actividad hemolítica y citotóxica (103).

Nucleasa

Sma secreta una nucleasa con capacidad de degradar ARN y ADN tanto simple como doble hebra. Está codificada por el gen *nucA* y requiere Mg^{2+} para su actividad óptima (104). Las bacterias pueden degradar ácidos nucleicos y usar ribosa o desoxirribosa como fuente de energía y nucleótidos para la síntesis de ADN y ARN. Por lo tanto, esta enzima promovería el crecimiento de *Sma*. Asimismo, se ha reportado que presenta actividad anti-viral y anti-tumor (105).

I.2. Vesículas de membrana externa

Las vesículas de membrana externa, también llamadas OMVs (outer membrane vesicles) son nanopartículas delimitadas por una bicapa lipídica, esféricas, de tamaño heterogéneo (10-300 nm de diámetro) (106). Las OMVs se producen cuando pequeñas porciones de la membrana externa (ME) protruyen desde la bacteria para finalmente separarse y liberarse al medio extracelular. Se cree que todos los tipos de bacterias Gram negativas son capaces de producir OMVs en todas sus fases de crecimiento, y en una variedad de ambientes incluyendo cultivos planctónicos, biopelículas, ambientes de agua dulce y marinos, dentro de células eucariotas y dentro de mamíferos hospedadores. Dado su origen, están formadas principalmente por componentes de membrana externa, como fosfolípidos, proteínas y lipopolisacárido (LPS). Los análisis proteómicos y bioquímicos han revelado que las OMVs también

encapsulan material periplásmico, enzimas, peptidoglicano, ADN y ARN; y se asocian con proteínas solubles adherentes en su cara externa (107, 108). Todas estas moléculas que forman parte de las OMVs, permiten a las vesículas transportar mucho del material biológico producido por la bacteria parental hacia sitios distantes, permitiendo que se les atribuyan una gran variedad de funciones como la transferencia de factores de virulencia, la modulación de la patogénesis, la comunicación interbacteriana y el mantenimiento de comunidades microbianas, entre otras (109).

I.2.1. Biogénesis de OMVs

Al día de hoy no se ha postulado un mecanismo molecular aunado que dirija la biogénesis de OMVs; por el contrario, la evidencia acumulada nos permite indicar la existencia de múltiples vías de generación de vesículas.

Uno de los modelos propone la vesiculización está favorecida en áreas donde el entrecruzamiento entre la membrana externa y el peptidoglicano subyacente está reducido (figura I.1.A). Los componentes constituyentes de dicho entrecruzamiento han sido extensamente estudiados en *E. coli*; sin embargo, se conoce poco acerca de su dinámica de síntesis/reciclado, y de la homogeneidad de su distribución. OmpA es una proteína de membrana externa que contiene un sitio de unión periplásmico para el ácido diaminopimélico (DAP), un componente del peptidoglicano (PG) (110). Mutantes de *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Acinetobacter baumannii* carentes de OmpA muestran un fenotipo hipervesiculizante, probablemente como consecuencia de un entrecruzamiento deficiente entre el PG y la membrana externa (111–113). Otros componentes intervinientes en este entrecruzamiento son: el complejo Tol-Pal, formado por las proteínas TolA, TolB, TolQ, TolR y Pal, que se extiende desde la membrana citoplasmática a través del periplasma hasta la membrana externa, sitio en el cual Pal se ancla a través de un motivo N-terminal diacilglicérido mientras que interactúa fuertemente con el PG mediante su región C-terminal (114); y Lpp o lipoproteína de Braun: la lipoproteína más abundante en bacterias Gram negativas, un tercio de la misma encontrándose covalente entrecruzada con el PG, constituyendo así el anclaje más relevante de esta estructura a la membrana externa. En el pasado, se reportó que tanto mutaciones en el sistema Tol o la carencia de Lpp provocan fenotipos muy marcados de hipervesiculización. Sin embargo, defectos en este sistema también causan una pronunciada inestabilidad de membrana (111, 112, 114). Nuevos estudios analizando cambios más sutiles revelaron que distintas condiciones de la envoltura controlan la producción de vesículas. Por caso, en la mutante hipervesiculizante *nlpI* de *E. coli*, el número de enlaces Lpp-PG fue 40% menor que en

la cepa salvaje. Nlpl es una lipoproteína de membrana externa que participa en la división celular; también se encontró que controla la actividad de una endopeptidasa del PG denominada Spr. Por ende, se postula que un balance alterado de síntesis y reciclado del PG en la cepa *nlpl* previene la formación de entrecruzamientos correctos entre Lpp y PG, provocando indirectamente el aumento en la producción de vesículas (115).

A pesar del rol crucial que parecería tener Lpp, un segundo modelo propone que la biogénesis de vesículas es independiente del número de enlaces Lpp-PG. El mecanismo surgió a partir del estudio de mutantes que hipervesiculizan como consecuencia de una respuesta de estrés general a proteínas mal plegadas, o a altas concentraciones de proteínas de la envoltura, fragmentos de PG y/o LPS aberrante (figura I.1.B). Todos estos componentes se acumularían en nano-territorios relativamente libres de Lpp entrecruzado, permaneciendo el número total de entrecruzamientos Lpp-PG constante alrededor de toda la envoltura. La acumulación provocaría una presión de turgencia que induciría la protrusión y gemación de las vesículas, removiendo así los componentes no deseados de la célula (116, 117).

Otros estudios se han focalizado en el impacto que la composición lipídica de la membrana externa tendría sobre la producción de vesículas (figura I.1.C). Por ejemplo, en la bacteria antártica *Pseudomonas syringae*, ácidos grasos de cadena par están altamente enriquecidos en las OMVs. En estas vesículas también se detectaron ácidos grasos insaturados y de cadena ramificada; se sugiere así que una flexibilidad de membrana incrementada en áreas de enriquecimiento de estos lípidos promovería la biogénesis de las OMVs. Por otra parte, ciertos subtipos de LPS pueden estar también enriquecidos en las OMVs e influir directa o indirectamente la composición de las mismas y en la curvatura de la membrana externa. *Pseudomonas aeruginosa* expresa dos tipos de antígeno O en su LPS: uno neutral y más corto (banda A), y otro cargado negativamente y de mayor longitud (banda B), que se encuentra sobre-representado en OMVs. Mutantes que expresan sólo la forma neutral producen OMVs más pequeñas con un contenido más disímil a la OMVs salvajes, en comparación con el contenido vesicular de las mutantes que sólo expresan la forma aniónica del LPS (118, 119). También en *P. aeruginosa*, el impacto de cambios en la curvatura de membrana en la biogénesis de OMVs ha sido explorado en detalle con la molécula de *quorum sensing* 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona o PQS (*Pseudomonas quinolone signal*). Dicha molécula es altamente hidrofóbica y se une al LPS. El modelo postula que, tras la

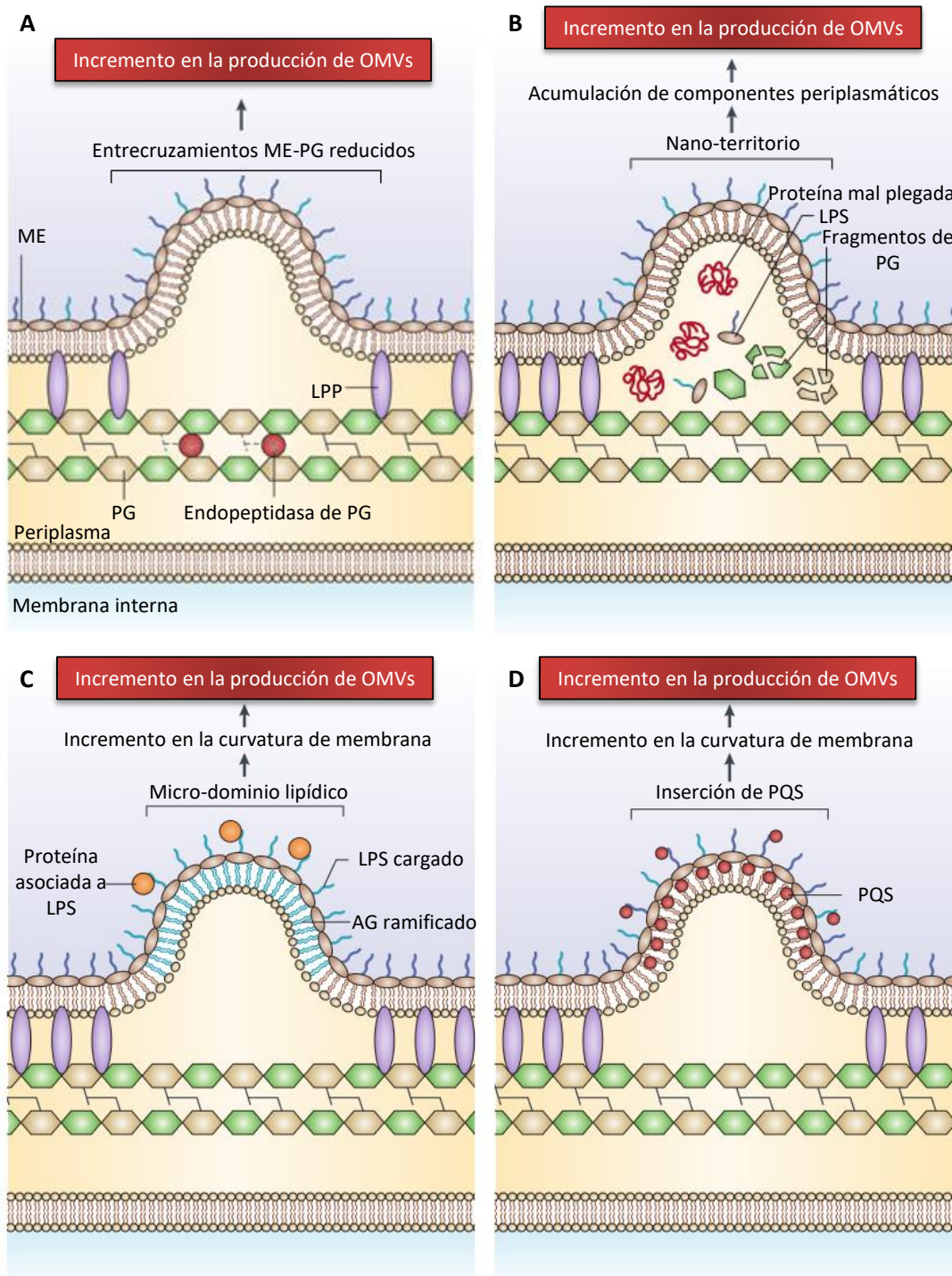


Figura I.1. Modelos de biogénesis de OMVs. (A) La producción de OMVs se incrementaría en zonas donde el entrecruzamiento entre la ME y el PG subyacente se encuentra reducido. Lpp es el principal responsable de este anclaje; y endopeptidasas de PG involucradas en su síntesis/reciclado, gobernarían la capacidad de la envoltura para establecer los entrecruzamientos. (B) La acumulación de componentes periplasmáticos en nano-territorios localmente carentes de entrecruzamientos ME-PG provocaría una presión de turgencia, favoreciendo la secreción de vesículas. (C-D) Micro-dominios lipídicos enriquecidos en determinados tipos de fosfolípidos o LPS, o bien la inserción de PQS en la cara externa de la ME, poseerían una mayor propensión a curvarse y producir OMVs. Adaptado de Schwechheimer y Kuehn, 2015 (117).

unión, la cara externa de la membrana se expande en relación a la cara interna, y se promovería la repulsión aniónica sobre la superficie bacteriana, induciendo la curvatura de membrana y promoviendo la vesiculización (figura I.1.D) (120). Un par de reportes recientes contribuyeron a resaltar la importancia del carácter lipídico de la membrana en la biogénesis de OMVs. Por un lado, se identificó que la deacilación del lípido A favorece la biogénesis de OMVs en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (121). Por otro lado, se encontró que una expresión reducida del transportador conservado de fosfolípidos VacJ/Yrb ABC resulta en la acumulación de fosfolípidos inductores de curvatura en la membrana externa, que facilitan la gemación y liberación de vesículas (122).

Si la composición lipídica es clave en la biogénesis de OMVs, entonces sería esperable que cambios en la temperatura de crecimiento alteren los niveles de vesiculización, dado que este factor modula directamente la dinámica de las bicapas lipídicas. Sin embargo, los efectos dependientes de temperatura parecen ser especie específicos. En *E. coli*, a medida que la temperatura aumenta, también lo hacen los niveles de OMVs, probablemente como consecuencia del incremento de la fluidez de membrana. Sin embargo, en el psicrófilo *Shewanella livingstonensis*, *Serratia marcescens*, y *Bartonella henselae*, menores temperaturas resultaron en un incremento de vesiculización (117, 123).

I.2.2. Carga proteica de las OMVs

El transporte mediado por vesículas de proteínas bacterianas se considera actualmente como un nuevo sistema de secreción. Muchas de las investigaciones en el campo de las vesículas se han centrado en estudiar su composición proteica e indagar sobre los mecanismos en que dicha carga se selecciona y enriquece en las OMVs. Los mecanismos exactos por el cual la carga bacteriana ingresa o se asocia a las OMVs permanecen sin dilucidarse; sin embargo, comparaciones entre los proteomas de OMVs y de membrana externa hacen evidente la existencia de mecanismos de selección/exclusión de factores proteicos (123). Estos mecanismos podrían tener su fundamento en la interacción diferencial de determinadas proteínas de membrana externa (o asociadas a ella), o de los lípidos de membrana con la cara periplasmica de la membrana externa. Haurat *et al.* –utilizando a *P. gingivalis* como modelo- han propuesto que las proteínas se compartimentarían como consecuencia de sus afinidades hacia un motivo glucídico particular, hacia la carga iónica, o hacia el largo de las moléculas de LPS que pasarán a formar parte de las OMVs; mientras que proteínas que interaccionan preferentemente con el LPS retenido en membrana

externa son retenidas allí. En particular, se encontró que las gingipaínas son proteasas asociadas a las OMVs a través de su interacción con la forma aniónica del LPS (A-LPS); mutaciones que impiden la síntesis del mismo provocan la disminución de los niveles de gingipaína asociados (124). Estudios en especies del género *Bacteroides* han sugerido que las proteínas se empaquetan en OMVs en base a su carga, que en ese caso resultó acídica para la mayoría de las proteínas vesiculares (125). Por otro lado, una señal de empaquetamiento para cargas solubles ha sido identificada en *E. coli*: cuando una secuencia C-terminal -que dispara la respuesta de estrés de envoltura dependiente de σE - se añadió a proteínas solubles, las quimeras se enriquecieron unas diez veces en las vesículas (126).

Además de proteínas de membrana externa, en la mayoría de los casos, se detectan proteínas extracelulares, citoplasmáticas y de membrana interna. Para los dos últimos casos, es todavía un misterio como dichas proteínas entran o se asocian con OMVs; sin embargo, constituye un fenómeno de gran interés, tanto en su aspecto mecánico como funcional.

I.2.3. Funciones de las OMVs en patogénesis

Las funciones que se han atribuido a las vesículas durante el proceso patogénico son varias. Por un lado, existe un gran número de evidencias que señalan a las OMVs como un vehículo de transporte para los factores de virulencia hacia las células blanco. Asimismo, las vesículas también pueden cumplir funciones defensivas durante la infección un rol, mediante el secuestro de antibióticos y anticuerpos, así como también como señuelos antigénicos para desviar la atención del sistema inmune lejos de la células bacteriana. A continuación, revisaremos estas funciones y resumiremos lo que se conoce sobre su interacción con las células hospedadoras.

I.2.3.1. Transporte de factores de virulencia

En asociación con las OMVs de numerosas bacterias Gram negativas se han encontrado toxinas biológicamente activas y otros factores de virulencia (tabla I.I). Algunos de estos factores se encuentran selectivamente enriquecidos en las vesículas. Originalmente, Beveridge propuso dos ventajas potenciales del transporte mediado por vesículas sobre el transporte en forma soluble: (i) las OMVs concentran los factores de virulencia y permiten el reparto dirigido de los mismos hacia las células blanco; y (ii) los factores de virulencia dentro del lumen de las vesículas se encuentran protegidos de la degradación y/o el reconocimiento ya sea por factores del hospedador

o de otros microorganismos (118). Así, se piensa que en especies patógenas, la secreción selectiva de factores de virulencia ha evolucionado como un beneficio. De hecho, generalmente las especies patógenas producen más vesículas que sus variantes no patógenas (127, 128). La respuesta de la célula hospedadora a la entrega de una toxina asociada a vesículas será probablemente distinta a la respuesta frente a la toxina soluble, si el ingreso de la toxina asociada a las OMVs es coincidente con el ingreso mismo de las vesículas. En algunos casos, las toxinas asociadas a OMVs son incluso más activas que las toxinas libres. En otros casos, los factores de virulencia no se transportan en el lumen, sino que se asocian con la cara externa de las vesículas.

Tabla I.I. Factores de virulencia asociados a OMVs de varias bacterias Gram negativas.

Especie	Factor de virulencia asociado	Rol funcional	Referencia
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Leucotoxina	Citotoxicidad	(129)
	Toxina distensora citoletal (CDT)	Arresto del ciclo celular	(130)
<i>Bacteroides fragilis</i>	Hemaglutinina	Hemaglutinación	(131)
	Proteasas	Actividades enzimáticas	(125)
<i>Bordetella pertussis</i>	Adenilato ciclasa- hemolisina	Respuesta inmune	(132)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Lipasa, fosfolipasa-N, metaloproteasa	Actividades enzimáticas	(133)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Toxina distensora citoletal (CDT)	Arresto del ciclo celular	(134)
<i>Escherichia coli</i>	Citolisina A (ClyA)	Citotoxicidad	(135)
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	Enterotoxina termolábil (LT)	Enterotoxigenicidad	(136)
<i>E. coli</i> extra-intestinal (ExPEC)	α -hemolisina	Citotoxicidad	(137)
<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	Factor citotóxico necrotizante 1 (CNF1)	Citotoxicidad	(138)
<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC O157:H7)	Toxina Shiga	Citotoxicidad	(139)
<i>Helicobacter pylori</i>	Citotoxina vacuolizante (VacA)	Vacuolización	(140)
	Antígeno inmunodominante CagA	Citotoxicidad	(141)
<i>Legionella pneumophila</i>	Infectividad a macrófagos	Inhibición de la fusión macrófagos-lisosomas	(142)
	Metaloproteasa ProA1	Actividad hemolítica y citotóxica	(143)

	Hsp60, difosfohidrolasa	Adherencia a cél. epiteliales	(143)
<i>Myxococcus xanthus</i>	Transportadores TonB	Comunicación intercelular	(144)
<i>Neisseria meningitidis</i>	PorA, PorB	Resistencia al suero	(145)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gingipaínas (cisteína proteasas)	Clivaje del CD14	(146)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	β -lactamasa	Resistencia a β -lactámicos	(147)
	Fosfolipasa hemolítica C	Citotoxicidad	(148)
	Fosfatasa alcalina	Formación de biopelícula	(149)
	Cif	Secreción de Cl (-) mediada por CFTR	(150)
<i>Salmonella enterica</i>	PagC	Aceleración de la	(151)
	PagL	vesiculización	(121)
<i>Salmonella typhi</i>	Citolisina A (ClyA)	Citotoxicidad	(135)
<i>Shigella flexneri</i>	Antígenos de invasión plasmídicos IpaB, IpaC, IpaD	Invasión	(152)
<i>Shigella dysenteriae</i>	Toxina Shiga 1	Citotoxicidad	(153)
<i>Treponema denticola</i>	Proteasas, dentilisina, factores adhesivos	Alteración de las uniones estrechas	(154)
<i>Vibrio cholerae</i>	Toxina RTX	Entrecruzamiento de actina	(155)
	Proteasa PrtV	Efectos morfológicos	(156)
	Toxina colérica (CTx)	Aumento intracelular de AMPc	(157)
<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Proteína símil a pilina P, porinas, quitinasa, proteína símil a cola de fago	Actividad larvica y quitinolítica	(158)

Por ejemplo, en el caso de las OMVs producidas por *E. coli* ETEC, la toxina LT no sólo es tóxica sino que provoca la internalización de otros componentes bacterianos, incluyendo proteínas de membrana, periplásmicas, y endotoxina a la célula hospedadora (159). Más del 95% de la actividad LT secretada se encuentra asociada a OMVs. Luego de su secreción a través de la membrana externa mediante el sistema de secreción tipo II (SSTII), LT se asocia al LPS en la cara externa de las OMVs (160).

Otro estudio determinó que la α -hemolisina de *E. coli*, normalmente expresada en aislamientos extra-intestinales (ExPEC), localiza en una alta proporción con OMVs (137). Se sugirió que la α -hemolisina se asociaría con la cara externa de las OMVs luego de ser secretada a través de un SSTI dependiente de Tol-C. Estos descubrimientos estimularon investigaciones acerca del potencial de otras proteínas secretadas por SSTI de localizar con OMVs, y de cómo los componentes de la

maquinaria de secreción podrían influenciar la formación y las propiedades de las OMVs.

Un caso paradigmático en el que la toxina asociada a OMVs es incluso más activa que la toxina libre es el de la citolisina A (ClyA). ClyA es una citotoxina formadora de poros expresada por *E. coli* y otras enterobacterias, cuya forma secretada se ha encontrado en OMVs. Un estudio detallado sobre su secreción determinó que ClyA posee una habilidad intrínseca para translocarse al periplasma, donde es incorporada a las OMVs durante un proceso que incluye una oligomerización redox-dependiente. En el periplasma (un ambiente oxidante), dos residuos de cisteína de la proteína se encuentran formando un puente disulfuro, previniendo la oligomerización en este compartimento. Una vez que ClyA localiza en el lumen de las OMVs -ambiente probablemente con un estado redox diferente al del periplasma y donde la proteína aumentaría su concentración local- se reduce y es capaz de formar oligómeros activos que forman estructuras de poro en las vesículas. Así, la actividad de ClyA sobre células en cultivo fue mucho más potente cuando la toxina estaba incorporada a las OMVs que la mostrada por la proteína aislada y purificada a partir del periplasma (135). Estos resultados proveyeron una fuerte evidencia del rol fisiológico del transporte mediado por OMVs.

Las OMVs también tienen un rol importante en la liberación de la toxina Shiga del espacio periplásmico de *E. coli* entero-hemorrágica O157:H7 y *Shigella dysenteriae*. Se ha sugerido que la toxina Shiga residente dentro del lumen de las OMVs estaría protegida de la hidrólisis por proteasas externas (139, 153).

CagA, un efector oncoproteico secretado por un sistema de secreción tipo IV (SSTIV), se encontró asociado a OMVs en *Helicobacter pylori*. Luego de la internalización en las células hospedadoras, CagA induce la señalización celular y modula la proliferación celular, motilidad, diferenciación y polaridad (161). La citotoxina vacuolizante VacA, de *H. pylori* es un factor de virulencia secretado por un sistema de autotransporte tipo V (SSTV), y expresado por el 50-60% de los aislamientos clínicos de dicha bacteria. VacA asociada a vesículas fue biológicamente activa y mostró un rol significativo en la patogénesis (140).

I.2.3.2. Resistencia a compuestos antimicrobianos

Las OMVs son capaces de promover la protección a antibióticos de manera inmediata –mucho antes de que la bacteria desarrolle respuestas adaptativas que modifiquen o muten los blancos moleculares del mismo- dado que las vesículas hacen

las veces de señuelos capaces de unir o adsorber antibióticos u otras toxinas. En *E. coli*, el agregado de OMVs o el uso de una mutante hipervesiculizante incrementó la resistencia a los péptidos microbicidas polimixina B y colistina. Los fagos son también otro tipo de antimicrobianos, y tanto la adición de OMVs o una mutación hipervesiculizante incrementaron la viabilidad de *E. coli* cultivada con el fago lítico T4 (162).

Además de reducir la concentración efectiva en cultivo de estos antimicrobianos, las OMVs pueden también transportar enzimas que medien la protección a antibióticos. Se ha demostrado que β -lactamasas pueden ser empaquetadas dentro de las vesículas de *P. aeruginosa* y que la co-incubación con especies sensibles a beta lactámicos mejora su resistencia a dichos antibióticos (147). Las OMVs de *P. aeruginosa* son también vehículos de transporte de β -lactamasas de una bacteria a la otra. Por tanto, la resistencia antibiótica puede diseminarse entre la población bacteriana vía OMVs (118, 119, 163)

De manera sorprendente, las OMVs tienen el potencial para mediar la transformación bacteriana y podrían dispersar una resistencia antibiótica dentro de comunidades bacterianas heterogéneas. Estudios recientes han mostrado que las OMVs de *A. baumannii* median la transferencia de resistencia a carbapenemes tanto a través de la enzima de resistencia como de su ADN codificante (117). Se piensa que el ADN se asocia indiscriminadamente al exterior de las vesículas; sin embargo un estudio reciente ha demostrado que *Acinetobacter baylyi* es capaz de translocar ADN desde el citoplasma al periplasma, y subsecuentemente a las OMVs. Este mismo estudio indicó que se requieren proteínas de competencia de parte del organismo receptor, sugiriendo que las OMVs se lisan previo a la toma de ADN (164). González *et al.* (165) demostraron que una versión lipidada de la metalo- β -lactamasa NDM-1 se secreta vía OMVs en *E. coli*. Estas vesículas protegieron poblaciones susceptibles de bacterias frente a niveles letales de antibiótico; y además, se logró detectar el ADN codificante para dicha enzima en el interior de las OMVs.

I.2.3.3. Interacción de las vesículas con las células hospedadoras

Como vimos a partir de ejemplos anteriores, las OMVs pueden interactuar con las células hospedadoras, actuando como vehículos de reparto de factores de virulencia (revisados en la tabla I.I), y de moléculas inmunomodulatorias (como ser LPS y peptidoglicano). Esta interacción puede ocurrir directamente a través de un evento de fusión de membrana, o bien puede darse mediante una unión adhesina-

receptor, que puede en muchos casos proseguir con la internalización de la vesícula. Así, la interacción OMV-célula hospedadora puede no sólo resultar en un efecto tóxico, sino en una modulación de la señalización y de la respuesta inmune en la célula huésped.

I.2.3.4. Adherencia de las vesículas a las células hospedadoras

La unión de OMVs a células en cultivo ha sido documentada para una variedad de patógenos, como *E. coli*, *Shigella*, *Actinobacillus* y *Borrelia* (119, 129, 166, 167). En otro estudio, una amino-peptidasa asociada a vesículas incrementa la capacidad de las OMVs de *P. aeruginosa* de adherirse tanto a cultivos primarios como a líneas celulares epiteliales de pulmón, a pesar de que no está claro si la enzima participa directamente en la unión al receptor o en su procesamiento (168). Las OMVs también se localizaron en ambientes más complejos como un tejido infectado: se han detectado OMVs de *H. pylori* adheridas a células intestinales en biopsias de pacientes infectados (140). Las OMVs de *Bacteroides fragilis* poseen actividad hemaglutinina, lo que indica que son capaces de actuar como factores adhesivos entre células de mamífero (131).

I.2.3.5. Internalización de las vesículas en las células hospedadoras

En muchos casos, luego de la adherencia inicial, las vesículas pueden ser internalizadas en la célula hospedadora. Los mecanismos que permiten este proceso han sido recientemente revisados por O'Donoghue y Krachler (169).

La endocitosis mediada por clatrina ha sido señalada como una posible ruta de entrada de OMVs. Este tipo de endocitosis ocurre mediante la formación de depresiones recubiertas de clatrina de hasta 200 nm de diámetro. La internalización se inicia mediante la unión de un ligando a su receptor de superficie. La separación de la vesícula recubierta de clatrina requiere de dinamina, y la vesícula internalizada ingresa a la vía de tráfico endocítica. Recientemente, Vanaja *et al.* (170) demostraron que en células con una expresión silenciada de AP2, una proteína adaptadora requerida en el proceso de internalización de vesículas recubiertas de clatrina, había una respuesta reducida al LPS transportados en las OMVs de *E. coli* EHEC. Luego, el LPS escapa de los compartimentos endosomales e induce la actividad caspasa-11, provocando la producción de citoquinas y la muerte celular. Otros varios estudios han demostrado el rol de clatrina en la internalización de OMVs, pero al mismo tiempo han sugerido que las vesículas pueden compensar la ausencia de esta ruta de entrada a través de otras

vías. Asimismo, la identidad de los ligandos responsables de disparar el proceso ha permanecido sin esclarecerse (169).

Por otro lado, muchos estudios han adjudicado un rol a las balsas (*rafts*) lipídicas en facilitar el ingreso de OMVs (171–176). Estas balsas son micro-dominios de la membrana plasmática enriquecidos en esfingolípidos y colesterol, comparativamente más ordenados y compactos que las demás regiones de la membrana, cuyo agrupamiento induciría una curvatura de membrana, permitiendo la formación de invaginaciones en la célula hospedadora y la entrada de partículas a la misma (169, 177). Las balsas pueden estar también enriquecidas en caveolina; la oligomerización de esta proteína permite la formación de las caveolas, es decir, de invaginaciones de membrana de 80 nm de diámetro. La velocidad de internalización de las caveolas es alrededor de 5 veces menor que la endocitosis mediada por clatrina, sin embargo, la eficiencia de reparto de la carga al citosol es mayor, puesto que se cree que las caveolas internalizadas son capaces de evadir la fusión con compartimentos lisosomales y la subsecuente degradación, en contraste con las vesículas recubiertas de clatrina (169). Por ejemplo, la toxina colérica (CTx) es un factor de virulencia de *Vibrio cholerae* capaz de unirse al gangliósido GM1 presente en balsas lipídicas enriquecidas con caveolina sobre la superficie de la célula hospedadora. CTx se secreta tanto en su forma soluble como asociada a OMVs. Se demostró que durante la infección, CTx asociada a vesículas es capaz de unirse rápidamente a GM1, facilitando la internalización de las OMVs (157). Una interacción similar ha sido descrita entre GM1 y la toxina LT asociada a OMVs liberadas por ETEC (159).

La macropinocitosis es un mecanismo de endocitosis que involucra la formación de proyecciones de membrana (lamelipodios) sostenidas por una red de filamentos de actina, involucrada en las infecciones por virus y algunos patógenos bacterianos como *Shigella flexneri*. Se ha sugerido que las OMVs podrían ingresar a través de este mecanismo (108). Por ejemplo, la inhibición de la polimerización de actina redujo la internalización de OMVs de *P. aeruginosa* en células epiteliales respiratorias (150). Sin embargo, la macropinocitosis no es generalmente un proceso inducido por el cargo, y probablemente el ingreso mediante esta vía no sea un evento dirigido por OMVs.

Por último, a pesar de la disímil naturaleza entre las bicapas lipídicas de OMVs y aquellas de células eucariotas hospedadoras, la fusión de membranas también ha sido indicada como un mecanismo de ingreso. Por ejemplo, Bomberger *et al.* (150) utilizaron el fluoróforo auto quencheable Rodamina-R18 para marcar vesículas de *P. aeruginosa*, que fueron posteriormente co-incubadas con células epiteliales. Se

observó un incremento en la fluorescencia debido a que la mezcla de lípidos entre OMVs y membrana citoplasmática diluyó el colorante, permitiendo así la emisión de luz. La utilización de membranas modelo en combinación con técnicas de FRET ha confirmado la factibilidad de la fusión entre ambas clases de membrana (178).

I.2.3.6. Interacción de las OMVs con el sistema inmune innato

Existen múltiples reportes que atribuyen a las OMVs un rol en la evasión de la destrucción bacteriana mediada por el sistema de complemento. En el caso de *Vibrio cholerae*, sus OMVs contienen el factor proteico OmpU, capaz de ser reconocido directamente por anticuerpos IgG naturales, que luego median la unión de C1q sobre la superficie de la bacteria, provocando la sensibilidad al suero mediada por complemento. Se demostró que OMVs con OmpU como carga pueden hacer las veces de señuelo para la unión de IgG y el subsecuente reclutamiento de C1q, incrementado la supervivencia de aislamientos normalmente sensibles al suero de *V. cholerae* (179). Vesículas de *P. gingivalis* contienen la enzima PPAD, que desactiva las funciones del factor de complemento C5a y facilita la evasión inmune de la bacteria (109).

Por otro lado, está claro que las OMVs contienen una serie de patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), como el LPS, peptidoglicano, lipoproteínas, ARN, y ADN que pueden interactuar con receptores de reconocimiento de estos patrones en el hospedador. Estos receptores pueden: estar ubicados sobre la superficie celular, como el caso de los receptores de tipo Toll (TLRs); o localizar intracelularmente, como NOD1 y NOD2. Tras la detección del ligando molecular del receptor, se inducen cascadas de señalización que finalizan con la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, que en última instancia modulan la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL-8, que actúa reclutando células inflamatorias al lugar (109). Por ejemplo, luego de entrar a las células epiteliales hospedadoras, las OMVs de *H. pylori*, *Neisseria gonorrhoea* y *P. aeruginosa* son detectadas por el receptor citoplasmático NOD1, produciendo una respuesta inmune innata OMV-específica dependiente de dicho receptor (172). De manera similar, OMVs de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *V. cholerae* se internalizan en células epiteliales y activan respuestas inflamatorias dependientes de NOD1 y NOD2 (109, 176). En cuanto a los TLRs, se demostró que las OMVs de *S. Typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, y *P. gingivalis* median respuestas inflamatorias a través del TLR4 (109). Asimismo, el LPS transportado por las OMVs al citosol de la célula hospedadora

puede inducir la activación de un inflamosoma no canónico dependiente de caspasa-11, que sería un mecanismo crítico contra las infecciones bacterianas (170).

I.2.3.7. Interacción de las OMVs con el sistema inmune adaptativo

La inmunización con OMVs genera una fuerte respuesta de anticuerpos IgG y/o IgA específica de antígeno en el suero o en mucosas. Al ingresar al cuerpo, los antígenos de las OMVs son presentados por células presentadoras de antígenos a células T CD4+, que luego interactuarán con células B específicas, para promover su proliferación y diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos y células B de memoria. Se ha demostrado en experimentos con modelos de ratón que las OMVs pueden inducir una respuesta protectora durante la infección con una variedad de patógenos, incluyendo *V. cholerae*, *H. pylori*, *S. Typhimurium*, *Shigella flexneri*, disminuyendo la carga bacteriana y protegiendo al animal de la sepsis o la muerte (106, 108). Como veremos en la sección I.2.4, para el caso de *N. meningitidis* incluso existen vacunas basadas en OMVs.

Por otra parte, evidencias sugieren que las OMVs son capaces de suprimir la respuesta de células T. Por ejemplo, las OMVs de *H. pylori* son capaces de inducir la apoptosis en estas células a través de un mecanismo que involucra a las caspasas 3 y 7. Los autores demostraron que la toxina VacA asociada a estas OMVs no era esencial, pero sí incrementó la magnitud del fenómeno (180).

Las OMVs también serían capaces de modular la respuesta de las células B. Un ejemplo interesante lo brinda *Moraxella catarrhalis*. Este patógeno respiratorio es endocitado y eliminado por células B tonsilares; sin embargo, sus OMVs pueden interactuar y activar linfocitos B, permitiendo la sobrevivencia de las células bacterianas. Dos componentes de las OMVs resultaron necesarios para ello: el superantígeno MID (*Moraxella IgD-binding protein*) y motivos de ADN no metilado CpG. Los autores sugirieron que *Moraxella* evade la interacción directa con células B mediante el redireccionamiento de la respuesta adaptativa humoral usando a sus vesículas (con el superantígeno MID) como señuelos (181).

I.2.4. Funciones de las OMVs en la fisiología bacteriana

Además de su contribución a la patogénesis bacteriana, la producción de OMVs representaría un beneficio también para aquellas bacterias no patógenas, a pesar del costo energético asociado a la secreción de estos grandes complejos macromoleculares.

I.2.4.1. OMVs en la respuesta a estrés

De manera general, se ha observado que la producción de OMVs se incrementa cuando las bacterias se exponen a condiciones adversas, sugiriendo que las vesículas son una herramienta de respuesta al estrés. Muchos de los factores ambientales que dirigen la producción de vesículas han sido recientemente revisados por Orench-Rivera y Kuehn (182). Condiciones como la privación de hierro u oxígeno, la alta osmolaridad, la exposición a antibióticos, y la entrada en fase estacionaria estimulan la producción de vesículas y modulan su contenido, digitando así su rol funcional.

Particularmente, como se podría deducir a partir del segundo modelo de biogénesis de OMVs introducido previamente (figura I.1.B), la vesiculización funciona como un mecanismo de respuesta al estrés de envoltura. La utilidad de las vesículas para mantener la homeostasis de envoltura parece ser complementaria a otros mecanismos de respuesta a estrés transcripcionalmente controlados: generalmente, si alguno de estas vías se inactiva genéticamente, la secreción de OMVs aumenta. Por ejemplo, se demostró que niveles incrementados de vesiculización se correlacionaban con mutaciones en la respuesta periplasmática al estrés calórico dependiente de σE en *E. coli*, sugiriendo que la producción de OMVs se incrementa cuando productos tóxicos mal plegados o proteínas sobre-expresadas se acumulan en este compartimento (126). Por ejemplo, DegP es una chaperona-proteasa que degrada proteínas mal plegadas en el periplasma y es parte del regulón σE . Así, una cepa mutante *degP* presenta una acumulación de proteínas mal plegadas provocando un efecto letal a altas temperaturas. De manera interesante, en el lumen de las OMVs producidas por esta mutante se detectaron proteínas mal plegadas de membrana externa, que son normalmente sustratos de DegP; y además, la introducción de una segunda mutación que provoca hipovesiculización, aumentó la deficiencia en el crecimiento de estas bacterias (183). Una respuesta similar se observó para otros tipos de componentes residuales de la envoltura: la acumulación fragmentos de PG (tri- y tetrapeptidos anhidros) y de LPS provocó hipervesiculización; y en el caso del LPS, la acumulación fue letal en una mutante hipovesiculizante (116).

La vesiculización también tendría un rol en la respuesta a estrés oxidativo. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, la producción de OMVs se incrementó significativamente tras el tratamiento con peróxido de hidrogeno. El incremento fue dependiente, a su vez, de la capacidad de la bacteria de sintetizar la banda B del LPS, que como vimos anteriormente, está preferencialmente enriquecida en las vesículas de esta bacteria (184).

I.2.4.2. OMVs en comunidades bacterianas

Teniendo en consideración las propiedades funcionales y de distribución de las vesículas, algunos autores sugieren que actuarían como “servicios públicos” dentro de comunidades bacterianas mixtas, beneficiando tanto a aquellas bacterias productoras como al resto de la población microbiana. Se demostró que las vesículas de especies del género *Bacteroides* (miembros importantes de la microbiota humana) actúan como vehículos de transporte de un gran número de hidrolasas y polisacárido liasas, que permiten a aquellas bacterias que no producen estas enzimas metabolizar los polisacáridos para la adquisición de nutrientes (125, 185). Asimismo, las OMVs pueden considerarse como una fuente de nutrientes *per se* en la biosfera: el ADN y proteínas asociadas a ellas funcionarían como fuente de carbono y nitrógeno para promover el crecimiento bacteriano. Por ejemplo, OMVs utilizadas como única fuente de carbono de la cianobacteria marina *Prochlorococcus* promovieron el crecimiento de los organismos heterótrofos *Alteromonas* y *Halomonas* (186).

Las OMVs también pueden transportar proteínas de adquisición de hierro y receptores de superficie capaces de reconocer el grupo hemo, proveyendo a la bacteria acceso a este metal esencial para el crecimiento. Algunos reportes también sugieren que la adquisición de metales no estaría limitada sólo al hierro (117).

Las OMVs también han sido detectadas en biopelículas, donde se postula que promoverían interacciones entre las bacterias, contribuyendo a la integridad estructural de la macroestructura (187). Por caso, *Myxococcus xanthus* incrementa la producción de OMVs así como también de extensiones de membrana externa que parecerían interconectar a las células durante el crecimiento en biopelículas, en comparación con el crecimiento planctónico (188). Interacciones electrostáticas entre moléculas de ADN asociadas a las OMVs también contribuirían a la formación de estas estructuras (189).

Las OMVs también pueden tener un rol predatorio, proveyendo a la bacteria productora Gram negativa una ventaja en ambientes microbianos mixtos a través de la lisis de otras bacterias competidoras. La lisis de células vecinas puede liberar nutrientes que promuevan el crecimiento de la bacteria predadora. El caso mejor estudiado es el de *P. aeruginosa*, donde la carga de sus OMVs incluye una autolisina (mureína hidrolasa). Estas vesículas fueron capaces de degradar estructuras de PG de varias bacterias Gram negativas y positivas, provocando su lisis celular y muerte (119, 190). Además de *P. aeruginosa*, OMVs secretadas por otras 15 bacterias Gram negativas fueron capaces de lisar una variedad de bacterias Gram negativas y

positivas; sin embargo, las vesículas de *Pseudomonas* fueron las que mostraron el espectro predatorio más amplio (190).

Por último, se reportó que la molécula de *quorum sensing* PQS no sólo forma parte de la carga de las OMVs en *P. aeruginosa*, sino que la producción de vesículas está asimismo estimulada por esta molécula (191). Las OMVs podrían entonces contribuir a la comunicación intra- e interbacteriana como un vehículo de transporte de moléculas de *quorum sensing*, promoviendo la supervivencia en comunidades microbianas.

I.2.5. Aplicaciones tecnológicas de las OMVs

Como se discutió previamente, las OMVs interactúan con el sistema inmune adaptativo. Investigaciones sobre su uso como vacunas han estado desarrollándose desde hace varios años (192). La presentación conjunta nativa de antígenos bacterianos de superficie y de un adyuvante como el LPS hace de las vesículas una vía efectiva para generar una respuesta inmune adaptativa, haciendo factible su uso como vacunas acelulares. De hecho, vacunas basadas en OMVs ya han sido administradas en humanos, siendo la más exitosa de ellas la vacuna contra el serotipo B de *Neisseria meningitidis* (MenB). Estas preparaciones derivan de vesículas extraídas con detergente, que contienen una cantidad significativamente menor de LPS que las OMVs nativas. Estas vacunas proveen protección contra MenB a través de la inducción de la respuesta de anticuerpos sistémicos y de mucosa dirigida fundamentalmente contra las porinas PorA y PorB (193). También se ha avanzado en el desarrollo de vacunas contra otros patógenos tales como *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, *Burkholderia pseudomallei* y *Mannheimia haemolytica* (117). El incremento de la respuesta protectora de las OMVs y la reducción de su toxicidad mediada por LPS son dos desafíos por delante. La inclusión dirigida de antígenos protectores en las vesículas requerirá un mayor entendimiento de cómo y cuales proteínas se incorporan a las OMVs.

La utilización de las OMVs como vehículos especializados de reparto de drogas es otra de las aplicaciones promisorias que están en desarrollo. Gujrati *et al.* (194) diseñaron OMVs que presentaron una baja inmunogenicidad y un anticuerpo que las direccionó a células cancerosas; asimismo, las vesículas transportaron un ARN de interferencia que causó un silenciamiento génico, y en última instancia provocó la regresión de un tumor en un modelo murino, lo que demostró la potencialidad de las OMVs en el desarrollo de estrategias terapéuticas en humanos.

I.2.6. Vesículas de membrana en otras bacterias

La producción de partículas esféricas de membrana a partir de superficies celulares parece ser un fenómeno conservado entre todos los organismos procariotas, incluyendo bacterias Gram positivas y Archaea. A pesar de la gran diversidad estructural a nivel de membrana entre estos organismos, varios estudios han señalado funciones comunes llevadas a cabo por sus vesículas de membrana (MVs), incluyendo toxicidad, resistencia antibiótica, inmunomodulación, y adquisición de nutrientes (195). Sin embargo, esta composición diferencial de membrana implica a la vez que los mecanismos de biogénesis de estas MVs deben ser necesariamente distintos a aquellos de bacterias Gram negativas. Al día de la fecha, dichos mecanismos han permanecido poco estudiados.

La liberación de MVs a partir de bacterias Gram positivas es un fenómeno recientemente documentado. Por ejemplo, las MVs de *Staphylococcus aureus* poseen entre 20–130 nm de diámetro, son producidas *in vivo*, e inducen la muerte celular. La entrada de estas vesículas al citosol de la célula hospedadora depende de microdominios lipídicos ricos en colesterol (196), al igual que como hemos comentado previamente para OMVs de ciertos Gram negativos.

En *Mycobacterium tuberculosis*, se reportó que las MVs son inmunogénicas, modulando la respuesta inmune del hospedador a través del receptor tipo Toll TLR2. VirR controla la producción de las vesículas conteniendo el ligando para TLR2, y por tanto, controla el grado de estimulación de la respuesta inmune del hospedador, y consecuentemente, el crecimiento de *M. tuberculosis* en este ambiente (197).

Por último, existen unos pocos estudios sobre MVs en Archaea. Evidencias de microscopia electrónica de vesículas de *Sulfolobus acidocaldarius* e *Ignicoccus* indicaron la existencia de un proceso no caracterizado de gemación y desprendimiento de vesículas (198, 199). Las MVs de arqueas oscilan entre los 90 y 230 nm de diámetro y contienen lípidos de membrana y proteínas de la capa S, lo que sugiere que efectivamente derivan de la superficie celular. De manera interesante, MVs aisladas de *S. islandicus* contuvieron un factor proteico capaz de inhibir el crecimiento de otras especies de *Sulfolobus* (200). Se requieren estudios más profundos sobre los mecanismos de secreción de MVs de arqueas así como su funciones en la fisiología celular.

I.3. Sistemas de dos componentes

I.3.1. Generalidades

Las bacterias monitorean permanentemente las condiciones extracelulares y modifican su fisiología para adaptarse o evadir desafíos medioambientales. Esto es relevante en bacterias patógenas que han desarrollado evolutivamente la capacidad para colonizar, proliferar y diseminarse en diferentes nichos del organismo hospedador, siendo la regulación de la expresión génica en respuesta a condiciones ambientales o de estrés un rol crítico en la habilidad del patógeno para causar la enfermedad. La clave para la adaptación reside en la capacidad de expresar sólo aquellos genes para las enzimas y vías requeridas para el ambiente en que se encuentran. Para ello, se requiere la habilidad de reconocer la composición del medio ambiente. En eubacterias, uno de los mecanismos adaptativos más eficientes y ubicuos está constituido por sistemas de transducción de señales, predominando los “sistemas regulatorios de dos componentes” (TCS). Están presentes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, y se estima que las bacterias entéricas albergan alrededor de 50 sistemas de dos componentes diferentes que median la respuesta a una variedad de señales químicas y físicas (201). Los TCS se hallan también presentes en levaduras, hongos y plantas (202, 203). Hasta el momento, no se han identificado sistemas de dos componentes en animales (204).

Los TCS clásicos están compuestos básicamente por una proteína histidina quinasa sensora de membrana (HQ) y un regulador de respuesta citosólico (RR), ensamblados de acuerdo a un diseño en módulos. Una proteína sensora típica consiste en un dominio sensor N-terminal variable conectado al dominio C-terminal conservado que cataliza la fosforilación. Por su parte, una proteína reguladora de respuesta típica consiste en un dominio receptor conservado N-terminal y un dominio regulador C-terminal variable. Ante la presencia de un estímulo ambiental detectado por el dominio sensor, se induce la autofosforilación de un residuo de histidina conservado en el dominio catalítico de la HQ. Posteriormente, este grupo fosfato es transferido al dominio receptor de RR, ocasionando un cambio conformacional que lleva a la activación del dominio regulador C-terminal del mismo. El regulador de respuesta así activado tiene mayor afinidad por el ADN y funciona como modulador transcripcional. La posterior hidrólisis del grupo fosfato reinicia el sistema y le permite responder a nuevos estímulos (201, 204, 205).

Además de los sistemas de dos componentes clásicos, existen también sistemas no ortodoxos, comúnmente denominados de fosfotransferencia o *phosphorelay*. En estos sistemas, el grupo fosfato es transferido alternando entre varios residuos de histidina y aspartato ($H \rightarrow D \rightarrow H \rightarrow D$) presentes en dominios que pueden estar en proteínas individuales adicionales o formando parte de proteínas multidominios. La mayoría de estos sistemas posee histidina quinasas híbridas, las cuales se autofosforilan y transfieren el fosfato a un residuo de aspartato en un dominio receptor interno, en lugar de transferirlo a una proteína separada. Luego, el fosfato es subsecuentemente transferido a una histidina fosfotransferasa (HPT), que posee el residuo de histidina fosforilable pero carece de actividad autocatalítica, por lo que sólo sirve como intermediario fosforilado en estas vías. Finalmente, el fosfato es transferido al RR terminal. Se desconoce por qué algunos sistemas de transducción de señales usan fosfotransferencias simples, y otros, pasos múltiples. Una posibilidad es que los pasos intermediarios del *phosphorelay* proporcionen puntos adicionales para la regulación de la vía en función de diversos estímulos ambientales y como consecuencia, diferentes señales podrían definir la respuesta regulatoria (206) .

La bioquímica general de las reacciones de transferencia de fosfato es similar para todos los TCS, pero la señal que modula la actividad del sensor como así también el conjunto de genes objeto de la regulación son únicos y específicos para cada sistema. En bacterias con un gran número de sistemas de dos componentes, como *E. coli* y *Salmonella*, se evidencia que la mayoría de ellos son parálogos, o sea, originados por duplicación de uno o más sistemas ancestrales, que luego evolucionaron para responder a nuevas señales y adquirieron actividades reguladoras de respuesta específicas. En este sentido, se ha observado que, el dominio de detección del estímulo extracelular es muy heterogéneo en tamaño y estructura. Aunque la mayoría de ellos presentan regiones transmembrana, el número de las mismas varía entre uno y ocho o más, incluso cuando comparamos dos HQ parálogas altamente relacionadas, la secuencia aminoacídica de su región periplasmática, que es la responsable de la detección de la señal, muestra muy poca homología entre sí (204).

A continuación, se reseñará el conocimiento sobre el sistema de dos componentes CpxRA, que será de relevancia para el segundo capítulo de la presente Tesis.

I.3.2. El sistema CpxRA

El sistema de regulación de dos componentes CpxRA (o simplemente Cpx) modula la expresión de genes en respuesta al estrés periplasmático (207). Está compuesto de CpxA, una HQ sensora y CpxR, el RR citoplasmático. Si bien no se han identificado la naturaleza de la señal o las señales detectadas por CpxA, se han identificados varias condiciones que activan al sistema tales como el pH alcalino a neutro, la sobreexpresión de NlpE, de subunidades del pilus tipo P y de otras proteínas de la envoltura, alteraciones en la membrana y/o en la síntesis del antígeno común de enterobacterias (208). Además, algunos metales como el cobre y el zinc también activan el sistema por mecanismos que aún no han sido dilucidados (209).

Hasta el momento, se han identificado más de 50 genes regulados por CpxRA en *E. coli* (210). Los primeros miembros descritos del regulón Cpx fueron genes asociados al plegamiento y la degradación de proteínas periplásmicas, tales como *degP*, una serina endoproteasa periplasmática; *dsbA*, una disulfuro oxido-reductasa; y *ppiA*, una peptidilisomerasa A periplasmática (207, 211). Posteriormente, otros estudios condujeron a la identificación de otros miembros del regulón que pueden ser activados o reprimidos por el sistema y que se pueden agrupar en cuatro categorías funcionales: complejos proteicos de envoltura, proteínas de membrana interna, enzimas metabólicas del peptidoglicano, y otros reguladores celulares, como se detalla más adelante.

La detección de las señales por parte del sistema Cpx no se restringe únicamente a la HQ CpxA, sino que involucra al menos otras tres proteínas localizadas en distintos compartimentos celulares (figura I.2): la lipoproteína de membrana externa NlpE; la proteína periplasmática CpxP; y el regulador de respuesta citoplasmático CpxR (208).

NlpE se identificó por primera vez como un supresor de la toxicidad de la proteína de fusión de la envoltura LamB-LacZ-PhoA, y su expresión está regulada por CpxR (211, 212). Silhavy *et al.* (213) demostraron que NlpE activa el sistema CpxR en respuesta a la adhesión a superficies hidrofóbicas. Sin embargo, esta proteína accesoria no está implicada en la detección de otras señales que activan el sistema Cpx como el pH alcalino o el estrés generado por la sobreexpresión de la subunidad P del pilus (214). Asimismo, se desconoce cómo la señal detectada por NlpE se transmite a CpxA. Se conjetura que su dominio N-terminal podría desplegarse durante la adhesión a superficies hidrofóbicas, permitiendo que el dominio C-terminal interacte con la membrana interna; o bien que, ante una sobrecarga de la

maquinaria de plegamiento periplasmática, NlpE no se pueda plegar e insertar correctamente en la ME, y termine localizando en la MI, induciendo la respuesta del sistema Cpx (208).

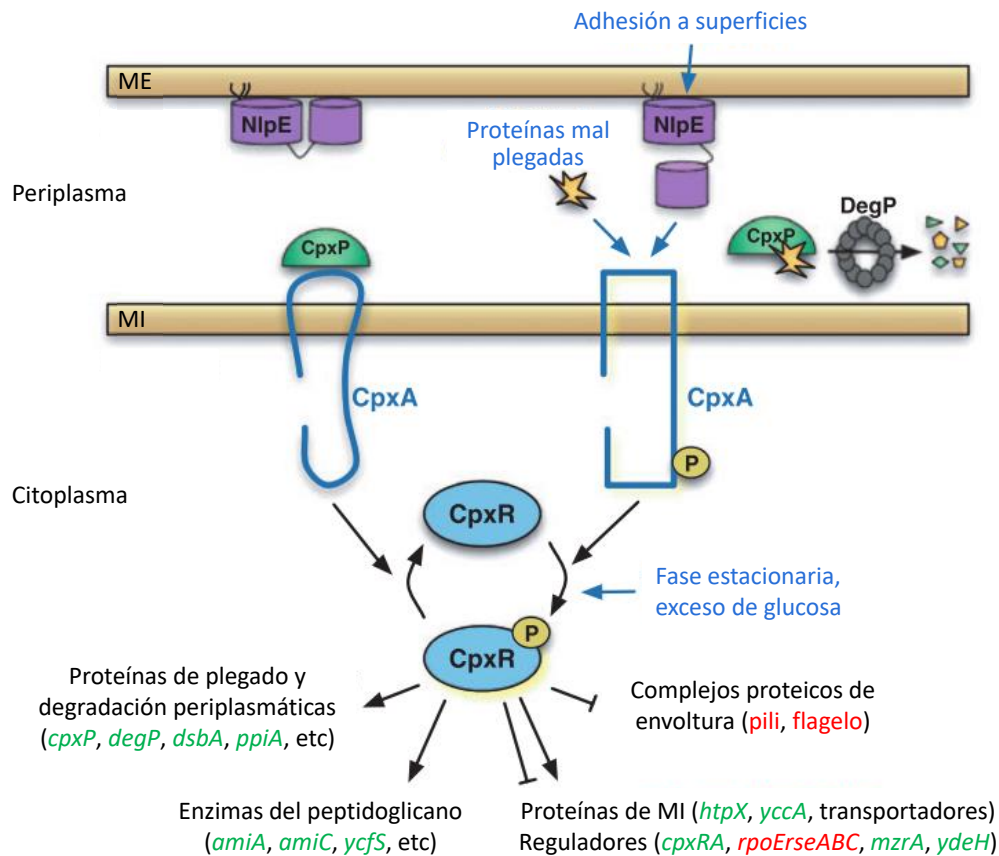


Figura I.2. Descripción general de la vía de Cpx en *Escherichia coli*. En condiciones no inductoras (lado izquierdo del diagrama), la HQ de membrana interna (MI) CpxA actúa como una fosfatasa del RR CpxR, manteniéndolo desfosforilado, y por lo tanto, inactivo. CpxP inhibe la activación de CpxA, posiblemente a través de una interacción directa. Las señales inductoras entran en la vía en varios puntos (indicados por las flechas azules): la adhesión a la superficie es detectada por la lipoproteína de membrana externa (ME) NlpE; proteínas periplasmáticas mal plegadas pueden ser detectados directamente por CpxP; y señales metabólicas o fases de crecimiento son detectadas por CpxR. Bajo condiciones inductoras (lado derecho del diagrama), CpxP es degradada por DegP, CpxA actúa como autoquinasa y fosforila a CpxR, que fosforilado se une al ADN para regular la transcripción. Los genes regulados positivamente por CpxR-P (indicados en verde) son los que codifican para proteínas plegado y degradación periplasmática; enzimas metabólicas de pared celular y algunos reguladores. Los genes reprimidos por CpxR-P (indicados en rojo) incluyen los complejos proteicos del periplasma y reguladores. Adaptado de Vogt y Raivio, 2011 (208).

CpxP es una proteína periplasmática modulada positivamente por CpxR (215), e involucrada en la retroalimentación negativa del sistema: CpxP inhibe la actividad del sistema Cpx cuando se sobre-expresa, probablemente por interacción directa con el dominio periplasmático de CpxA. La activación causada por la presencia de proteínas mal plegadas en el periplasma activa el sistema Cpx de manera dependiente de CpxP. Por lo tanto, se ha sugerido que las proteínas no nativas secuestran CpxP impidiendo su unión a CpxA y en consecuencia la proteína quinasa se activa (214, 216). Un hecho

importante es que CpxP se convierte en sustrato de la proteasa DegP bajo condiciones inductoras del sistema, favoreciendo la activación completa del sistema (216). Sin embargo, CpxP no es responsable de detectar otros tipos de estrés, ya que mutantes en *cpxP* conservan su capacidad de detectar señales tales como la sobreexpresión de NlpE, PapE o PapG, el pH alcalino, y otros tipos de estrés (214, 217).

En cuanto a la HQ sensora CpxA, las evidencias señalan que su dominio periplasmático es el punto de integración de las señales provenientes de NlpE y de CpxP, así como también puede detectar directamente perturbaciones tales como el pH alcalino, la sobreexpresión de PapE y PapG, y la perturbación de envoltura por EDTA (214, 217, 218). La forma en que este dominio detecta las distintas señales se desconoce, pero -al igual que en otros TCS- la detección de la señal es transducida a través de la membrana interna al dominio quinasa que lleva a cabo la transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta CpxR (219).

El regulador CpxR también puede activarse independientemente de CpxA en respuesta a señales relacionadas con el crecimiento y el metabolismo central. Por ejemplo, se ha reportado que la expresión de *cpxR* en *E. coli* se activa al inicio de la fase estacionaria (220), y que esta activación relacionada con la fase de crecimiento es dependiente de CpxR pero independiente de CpxA (214). CpxR también se puede activar de forma independiente de CpxA cuando las células se cultivan en presencia de exceso de fuentes de carbono, tales como la glucosa y el piruvato (221). Se postula que esta activación está mediada por la vía Pta-AckA, que genera acetil fosfato a partir de acetil-CoA (221). De hecho, el acetil fosfato puede fosforilar CpxR *in vitro* y, bajo determinadas condiciones de crecimiento, *in vivo* (207, 218, 221, 222).

Dependiendo del gen blanco, CpxR puede actuar como activador o represor. Un estudio comparativo realizado por Price y Raivio (209), en el que se caracterizó una biblioteca de expresión de genes regulados putativamente por CpxRA en *E. coli*, demostró que la orientación con respecto al sitio de inicio de la transcripción y el grado de consenso del sitio de unión para CpxR, previamente determinado como GTAAA-N₅-GTAAA, no influyen en la regulación. Así, la mitad de los promotores que mostraron una fuerte regulación CpxRA-dependiente, contiene un sitio de unión CpxR consenso que se orienta en una dirección directa en relación con la transcripción GTAAA-N₅-GTAAA, mientras que la otra mitad tienen sitios de unión CpxR orientadas en la orientación inversa, TTTAC-N₅-TTTAC. Además, varios de estos genes tienen sitios de unión CpxR en ambas orientaciones por lo que no parece haber relación entre la orientación y el modo en que CpxR ejerce su regulación. El grado de coincidencia con

la secuencia consenso GTAAA-N₅-GTAAA no siempre es predictivo: se caracterizaron genes con una fuerte regulación Cpx-dependiente con hasta tres cambios nucleotídicos en el sitio de unión al regulador respecto a la secuencia consenso (223).

Como se enunció anteriormente, el regulón Cpx se compone de una amplia variedad de genes. El sistema normalmente reprime la expresión de aquellos complejos proteicos que atraviesan la envoltura bacteriana y están involucrados en funciones como la motilidad, la quimiotaxis y la adhesión: el flagelo (a través de la represión de los genes *motAB-cheAW*, *tsr*, y *aer*), pili tipo P (operón *pap*), fimbrias tipo *curly* (*csgB* y *csgD*). Existe asimismo una conexión de la respuesta Cpx y proteínas de membrana interna; por ejemplo, CpxR fosforilado activa la expresión de *htpX*, una proteasa de MI que contribuiría a mantener la homeostasis de esta estructura en condiciones de estrés. Por otro lado, el sistema normalmente reprime la expresión de varios transportadores para diversos sustratos, tales como ácidos grasos, aminoácidos e iones. Otro constituyente de la envoltura bacteriana que es alcanzado por la amplitud de la respuesta Cpx es el peptidoglicano. CpxR activa directamente la expresión de *amiA* y *amiC*, genes codificantes para dos N-acetil-muramil-L-alanina amidasas, que hidrolizan entrecruzamientos peptídicos entre residuos de ácido N-acetilmurámico, permitiendo el proceso de división celular.

Asimismo, varios reguladores celulares estarían bajo control de CpxR. Este regulador modula negativamente de modo directo la expresión del operón *rpoErseABC*, que codifica el factor sigma alternativo σE , encargado de orquestar la respuesta de estrés por choque térmico (223, 224). CpxR también interactúa con el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR a través de la activación de MzrA, una proteína accesoria de MI que interactúa con EnvZ (la histidina quinasa de membrana), aumentando la expresión de los genes del regulón OmpR (225). YdeH es una diguanilato ciclasa capaz de sintetizar la molécula señalizadora di-GMP, y que es transcripcionalmente activada por CpxR. YdeH está implicada tanto en la inhibición de la motilidad, así como en la promoción de la formación de biopelículas (209, 223).

Por otra parte, en muchos casos, CpxR actúa en conjunto con otros reguladores para controlar la expresión de los genes. Por ejemplo, se ha demostrado que para la expresión de los transportadores MdtABC y AcrD y para la porina *ompC*, CpxR actúa como coregulador (226, 227). En ausencia del regulador principal de *acrD* y *mdtABC*, BaeR; o de *ompC*, OmpR, CpxR es incapaz de activar la transcripción de estos genes. Estos resultados indican que CpxR actúa en conjunto con el activador principal para intensificar la transcripción (227). Ensayos de protección a la digestión por ADNasaI sobre estos genes, indican que CpxR se une a grandes regiones corriente arriba de

los sitios de inicio de la transcripción y en todos los casos el sitio de unión se superpone parcialmente con el de activador principal. En cuanto a los casos de regulación negativa, se ha demostrado que CpxR es capaz de afectar negativamente la transcripción de *csgB*, *csgD*, *ompF* y *papB* (228). CpxR se une cooperativamente a múltiples sitios de la región promotora de *csgB* y *csgD* (229). En el caso de *csgDEFG*, el activador OmpR se une a un único sitio en el promotor, mientras que CpxR se une cooperativamente a múltiples sitios formando un complejo ADN-proteína de muy poca movilidad electroforética. Se desconoce si en este caso el efecto negativo de CpxR sobre la expresión de *csgD* se debe a que previene el reclutamiento de la ARN polimerasa o genera una perturbación en la unión de OmpR (229). Para el caso de *ompF*, los ensayos de protección a la digestión por ADNasaI indican que en el promotor de este gen, CpxR cubre una amplia región del mismo, superponiéndose con los cuatro sitios de unión de OmpR. Estas evidencias sugieren que en algunos casos CpxR se une a grandes regiones de ADN a través de múltiples sitios y que modula la acción de otros reguladores, sean estos activadores o represores.

En cuanto a la relación entre el sistema Cpx y la patogénesis, se ha descrito que mutantes en el sistema poseen defectos en la formación de estructuras de adherencia (ej: pili tipo IV en *E. coli* EPEC; pili tipo Pap en *E. coli* UPEC), y por tanto, disminuyen su capacidad de infectar las células hospedadoras (230, 231). En *Shigella flexneri*, se ha visto que CpxA está involucrada en la regulación dependiente de pH de *virF*, un regulador positivo de los genes de invasión *ipaBCD*. La expresión de *virF* se promueve mediante la unión directa de CpxR a su promotor (232). En contraste con estos ejemplos, estudios recientes sugieren que en muchos patógenos, la activación de la respuesta Cpx es detrimental para la virulencia. En casos en los que mutaciones en *cpxA* alteran su actividad fosfatasa, CpxR se acumula en su estado fosforilado, reprimiendo la expresión de factores adhesivos a las células hospedadoras, como ocurre en el modelo de *Yersinia pseudotuberculosis* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (208, 233). La expresión de sistemas de secreción asociados a proteínas de virulencia también se ha encontrado reducida por mutaciones en *cpxA*, incluyendo los SSTIII de EPEC y *Yersinia enterocolitica*, y el sistema de secreción de dos compañeros LspB-LspA2 de *Haemophilus ducreyi* (208). En *Legionella pneumophila*, CpxR inhibe la expresión de varios sustratos del SSTIV Icm/Dot involucrados en virulencia (234).

I.4. *Drosophila melanogaster*

I.4.1. Modelo de estudio

D. melanogaster, también llamada mosca de la fruta o mosca del vinagre, es una especie de díptero braquícero de la familia *Drosophilidae*. Recibe su nombre debido a que se alimenta de frutas en proceso de fermentación. Es una especie ampliamente utilizada como organismo modelo debido a numerosas ventajas. Los pequeños insectos son fáciles de mantener y manipular. En comparación con otros insectos, posee un breve ciclo de vida (15-21 días) y genera un gran número de crías.

Asimismo, poderosas herramientas genéticas han sido desarrolladas a lo largo de un siglo de trabajo. Posee un genoma reducido (4 pares de cromosomas) y completamente secuenciado (235), y un gran número de cepas modificadas genéticamente se encuentran fácilmente disponibles en bancos de almacenamiento y mantenimiento alrededor del mundo. La inducción de la expresión de varios transgenes puede darse de manera espacio-temporal mediante el uso del sistema UAS-GAL4 de levaduras (236, 237). La represión de la expresión génica puede lograrse combinando el sistema UAS-GAL4 con ARN de interferencia, donde el gen de interés se silencia a través de la síntesis de un ARN doble hebra inducida por el promotor GAL4 (238). A su vez, se pueden generar mutantes utilizando mutagénesis por transposición (239), o alimentando las moscas con etil-metanosulfonato (EMS), un agente altamente mutagénico (240, 241).

En cuanto a su pertinencia para el estudio de problemas relacionados con la salud humana, se calcula que aproximadamente el 61% de los genes de enfermedades humanas que se conocen tienen una contrapartida identificable en el genoma de *Drosophila* y el 50% de las secuencias proteicas tienen análogos en los mamíferos (242). La estructura de sus órganos es simple pero análoga a la de mamíferos. Además, este organismo modelo es hospedador de una sorprendente variedad de patógenos fúngicos, bacterianos y virales. En los últimos años *Drosophila* ha permitido la identificación de varios factores de virulencia de distintos patógenos oportunistas. Algunos microorganismos utilizan mecanismos similares para infectar insectos y mamíferos, y muchos factores de virulencia efectivos contra mamíferos también son responsables de la patogenicidad en *Drosophila*. Como resultado de esto, un gran número de microorganismos importantes para la salud humana han sido estudiados en el contexto de este insecto (243).

Las infecciones humanas en heridas, sistémicas o intestinales pueden ser mimetizadas fácilmente en *Drosophila* a través de ensayos de herida séptica, inyección e infección oral, respectivamente. El método de herida séptica en el tórax o abdomen involucra el uso de una aguja embebida en una solución bacteriana. Si los insectos se lastiman en el tórax, la herida ocurre en la cutícula y el músculo que se encuentra por debajo. Luego de la inoculación la bacteria puede proliferar localmente y diseminarse a través del cuerpo del insecto, lo que lleva a un daño tisular y respuesta inmune local y sistémica. Un segundo método utiliza una jeringa inyectora que produce principalmente la inoculación sistémica de las bacterias. Utilizando este método, la inyección ocurre directamente en la hemolinfa del insecto evitando la barrera del sitio de la herida. Por otra parte, el modelo de infección oral, permite mimetizar la infección intestinal en mamíferos e introducir los microorganismos en el tracto intestinal de *D. melanogaster*. Este método posee la ventaja de permitir fácilmente la cuantificación de la regeneración epitelial intestinal, que es dirigida por vías de señalización evolutivamente conservadas (243).

I.4.2. Inmunidad

Las larvas de *Drosophila* se alimentan de frutas y vegetales en descomposición, y por ende, encuentran un gran número de comunidades microbianas. Los microbios interactúan con *Drosophila* en el tracto digestivo, tráquea, genitales, y otros epitelios, así como también pueden diseminarse sistémicamente a través de heridas físicas. *Drosophila* carece de una respuesta inmune adaptativa a los microorganismos; sin embargo, el sistema inmune innato provee a estos insectos una protección suficiente contra la mayoría de los microbios. Esto hace de *Drosophila* un modelo adecuado para el estudio de la respuesta inmune innata, cuyos mecanismos están bien caracterizados y han llevado al descubrimiento de varios sistemas homólogos en mamíferos (244).

Una herida séptica en *Drosophila* resulta en la activación de varios mecanismos distintos de respuesta inmune contra los microbios en la cavidad corporal. Por un lado, la activación de un número de cascadas proteolíticas provoca el depósito de melanina en el sitio de la herida, y la concomitante producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) (245, 246). Los microbios sobrevivientes son fagocitados por los hemocitos (247). A la vez, se activa la respuesta inmune sistémica, capaz de reconocer diferentes clases de microorganismos invasores. La señalización corriente abajo resulta en la translocación nuclear de factores de transcripción del tipo NF- κ B, disparando la expresión de péptidos antimicrobianos (AMPs) activos contra muchos

tipos de microbios (248, 249). El epitelio de *Drosophila* está protegido por varias barreras físicas y químicas, tales como la cutina y la matriz peritrófica, y la producción de ROS y AMPs, respectivamente (250). A continuación, se describirán las diferentes ramas de la respuesta inmune de este organismo modelo.

I.4.2.1. La respuesta inmune sistémica

Los microbios en el hemocèle son reconocidos a través de sus componentes estructurales, es decir sus PAMPs, activando cascadas de señalización, que conllevan a la síntesis y secreción de AMPs por las células grasas (*fat bodies*), y posiblemente en los hemocitos.

La vía Toll

La vía Toll responde principalmente a bacterias Gram positivas y fungi (248, 249, 251). Las paredes celulares de muchas bacterias Gram positivas contienen PG del tipo lisina. El genoma de *Drosophila* codifica PGRP-SA que se une preferentemente a esta clase de ligandos. Otro receptor, GNBP1, también se reportó como componente en la detección del PG del tipo lisina. La interacción física de PGRP-SA y GNBP1 da lugar a la formación de un complejo proteico luego del reconocimiento de bacterias Gram positivas (252). PGRP-SD también detecta PG del tipo lisina con una redundancia parcial al complejo PGRP-SA-GNBP1 (253). Por otro lado, hongos filamentosos y levaduras son reconocidos mediante dos mecanismos diferentes. En el primer mecanismo, estos microbios son detectados a través de sus estructuras de pared celular -más precisamente los glucanos β -(1,3)- gracias a la molécula de reconocimiento circulante GNBP3, la cual subsecuentemente activará una cascada proteolítica dependiente de ModSP. En la segunda, la serina proteasa Persephone es clivada y activada mediante factores de virulencia de los hongos así como también de algunas bacterias Gram positivas. Por ejemplo, una proteasa fúngica (PR1) es producida por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* la cual inicialmente digiere la cutícula de la mosca. Subsecuentemente, PR1 también clivará Persephone, disparando la vía de respuesta Toll. La activación de Toll por Persephone se encuentra regulada negativamente por Necrotic, un inhibidor de serina proteasa de la familia de las serpinas (254–256).

Las diversas señales descriptas en el párrafo anterior inician cascadas proteolíticas que convergen en la activación de SPE (*Spätzle processing enzyme*), la cual eventualmente procesa a Spätzle (Spz). La forma madura de Spätzle se une al receptor Toll. Como podemos deducir, en contraste con los TLRs de mamíferos, Toll

de *Drosophila* no se activa por PAMPs, sino a través de la citoquina Spätzle. La unión dispara un cambio conformacional en el cual el receptor Toll ahora dimérico, recluta mediante sus dominios TIR a la proteína adaptadora Myd88, la cual mediante su dominio DD (*death domain*) interacciona con otras dos proteínas más: Tube y Pelle. Estas tres proteínas juntas forman un complejo denominado TISC (*Toll-induced signaling complex*) (257). Pelle es una serina-treonina quinasa cuyo sustrato durante la respuesta inmune aún no se ha caracterizado. Bajo condiciones no inductoras, los factores nucleares Dorsal y/o DIF (*Dorsal related immunity factor*) se encuentran unidos al inhibidor Cactus (homólogo a I- κ B de mamíferos) y permanecen anclados en el citoplasma. Tras la activación de la vía Toll, mediante mecanismos no caracterizados, se produce la fosforilación y ubiquitinación de Cactus, provocando su degradación dependiente del proteasoma. Esto libera a Dorsal y/o DIF que, luego de la localización nuclear, se unen a elementos de respuesta κ B en el ADN, disparando la expresión de los genes blanco, incluyendo a aquellos codificantes para AMPs como *Drosomicina*, comúnmente usado como reportero de la vía Toll.

La vía Imd

La vía de inmunodeficiencia (Imd) es la responsable del reconocimiento de bacterias Gram negativas y algunos bacilos Gram positivos (248). A pesar de que el LPS es altamente inmunógeno en mamíferos, se cree que el mismo no sería reconocido por *Drosophila* (258). La señal reconocida por el sistema es el peptidoglicano del tipo diaminopimélico (PG tipo DAP), típico de bacterias Gram negativas. Las proteínas de reconocimiento de PG (PGRPs) son las encargadas de detectar este tipo de estructuras. El genoma de *Drosophila* codifica para 13 proteínas de este tipo, que pueden ser categorizadas como catalíticas (con actividad amidasa), o no catalíticas. PGRP-LC and PGRP-LE son dos miembros no catalíticos que detectan el PG tipo DAP y activan la vía IMD. PGRP-LC, una proteína transmembrana, es el principal receptor. Existen tres isoformas de PGRP-LC (a; x; y), cada una presentando diferentes dominios extracelulares. Los homodímeros de PGRP-LCx unen PGs poliméricos, mientras que los PG de longitud menor son reconocidos por heterodímeros de PGRP-LCx y PGRP-LCa. Por otro lado, PGRP-LE se puede clivar reteniendo sólo su dominio de reconocimiento y funcionando de manera soluble en la hemolinfa; o bien, actúa como un receptor intracelular en su forma completa, donde une PGs monoméricos (248, 249).

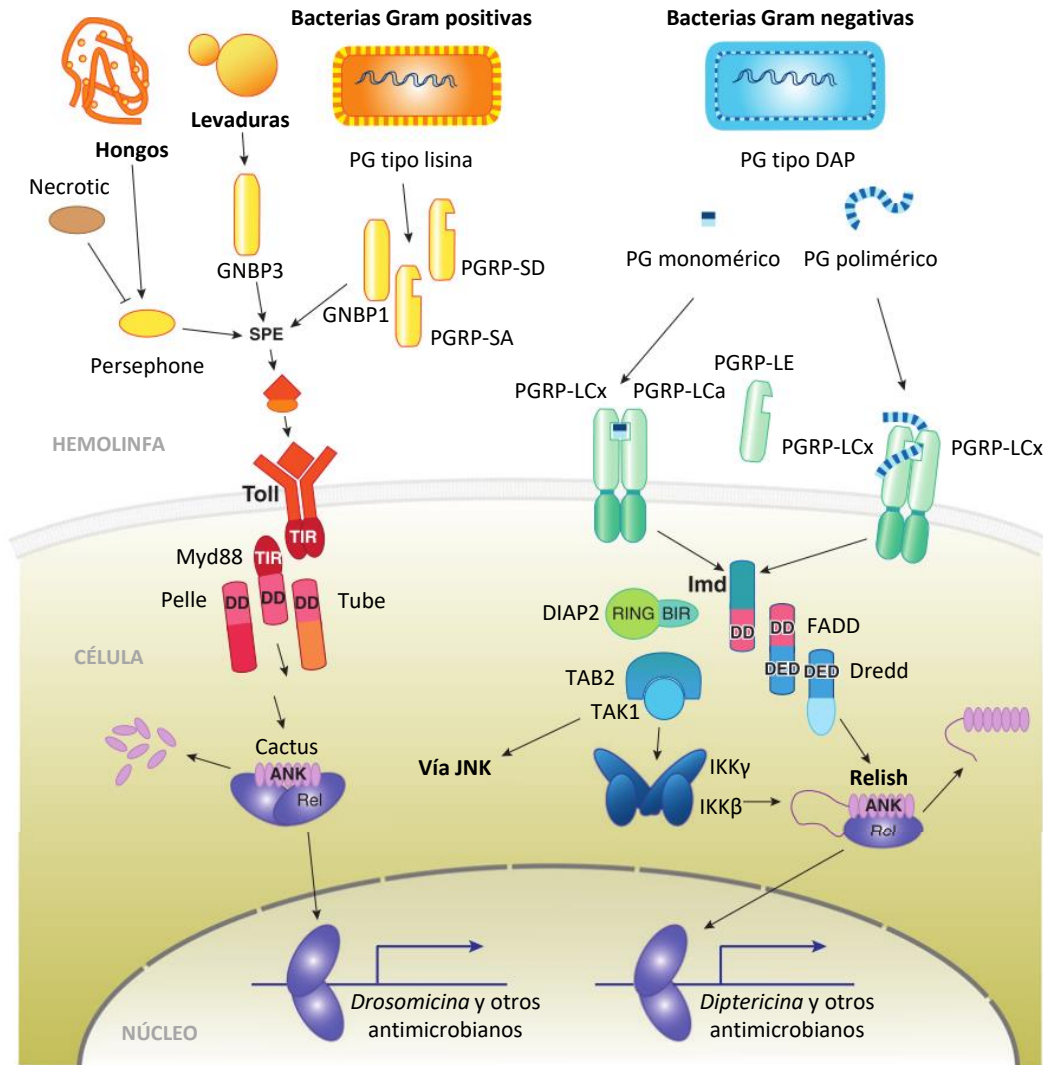


Figura I.3. Modelos de activación de las vías Toll (a la izquierda) e Imd (a la derecha). Adaptado de Lemaitre y Hoffmann, 2007 (249).

Luego de unir su ligando, los dominios citoplasmáticos de las PGRPs dimerizan o multimerizan, reclutando mediante interacciones homotípicas a la proteína adaptadora Imd, la cual posee un motivo DD (*death domain*). IMD juega un rol central a través de la iniciación de dos procesos de transducción de señal distintos, pero ambos convergentes en la activación de la vía IMD y la translocación nuclear de Relish, un factor de transcripción del tipo NF-κB, estructuralmente similar a los precursores p100 y p105 de mamíferos. El primero de estos procesos es la fosforilación de Relish. IMD, luego de activarse, recluta a la proteína adaptadora FADD que, a su vez, recluta la caspasa apical DREDD. Ésta produce el clivaje de IMD, exponiendo su motivo de unión a DIAP2. Se cree que DIAP2 hace las veces de E3 ubiquitina ligasa en *Drosophila*, y junto con la acción de otras proteínas, provoca la poliubiquitinación sobre IMD. Esta proteína poliubiquitinada sirve como soporte para el ensamblado de un complejo comprendido por una MAPKKK llamada TAK1, y su

subunidad reguladora TAB2. Se cree que TAK1 activaría el complejo de señalización IKK, formado por la subunidad quinasa catalítica IKK β y su subunidad reguladora IKK γ /Kenny, conduciendo eventualmente a la fosforilación de Relish. Por otra parte, el segundo proceso iniciado por IMD es el clivaje de Relish. Luego de ser reclutada por FADD unida a IMD, DREDD clivaría a Relish, en un proceso independiente de su fosforilación por el complejo IKK (Figura 1.3, lado derecho). Así, la forma fosforilada y clivada de Relish es ahora capaz de translocar al núcleo e inducir la expresión de los genes blanco, mayormente de AMPs (248, 249, 251).

Péptidos antimicrobianos

Luego de la sepsis, los AMPs son secretados a la hemolinfa como resultado de la activación de las vías IMD y Toll descritas anteriormente. Se han identificado 7 familias de AMPs: diptericanas (2 genes), drosocina, atacinas (4 genes), drosomicinas (7 genes), Metchnikowina, cecropinas (4 genes), y defensinas (2 genes). Diptericanas, drosocina y atacinas son activos contra bacterias Gram negativas; drosomicinas y metchnikowina contra hongos; cecropinas contra bacterias y hongos; mientras que las defensinas son específicas contra bacterias Gram positivas. Para monitorear la activación de la vía IMD y Toll, se usan los genes *Diptericina A* y *Drosomicina 1*, respectivamente (249).

La vía de las quinasas c-Jun N-terminal (JNK)

Muchos procesos fisiológicos tales como la citoprotección, apoptosis, autofagia, proliferación celular, diferenciación, reparación de tejidos, regeneración, metabolismo y crecimiento son influenciados en respuesta a la activación de la vía JNK. La vía JNK es activada por ROS, luz ultravioleta, y estrés calórico (259–261), así como también en respuesta a bacterias por la vía IMD (249). En este caso, TAK1 activa Hemipterous (JNKK) que fosforila a Basket (JNK) que a la vez activa AP-1. Algunos mecanismos de retroalimentación negativa han sido reportados entre las ramas IMD-Relish e IMD-JNK (262). Sin embargo, en otro estudio (263), la vía JNK activó la expresión de ciertos AMPs en células grasas, demostrando la complejidad del rol de esta vía.

La respuesta sistémica a la herida redox dependiente

En *Drosophila*, estudiando el proceso denominado “respuesta sistémica a la herida” o SWR (*systemic wound response*), W.J. Lee *et al.* (246) han caracterizado a Hayan, una serina proteasa circulante en hemolinfa. Tras la detección de la herida, Hayan se activa por mecanismos no caracterizados y es responsable del procesamiento de pro-fenoloxidasa (pro-PO) en fenoloxidasa (PO). Además de

promover la melanización (como se discutirá más adelante), la actividad enzimática de PO da lugar a la generación de ROS, las cuales actúan tanto local como sistémicamente. A nivel local, las ROS se acumulan de manera temporal, colaboran en la destrucción de invasores, y actúan como segundos mensajeros modulando la expresión de genes defensivos para la reparación de heridas y la migración de diferentes tipos celulares al sitio de la lesión. Por el otro lado, las ROS difunden sistémicamente a través del hemocoele, y llegan a los tejidos neuronales, donde actúan como señales de supervivencia activando programas citoprotectores dependientes de la vía JNK, probablemente a través de la oxidación e inhibición de las fosfatasa inhibitoras de JNK, convirtiendo sus grupos catalíticos sulfhídricos (-SH) en sulfénicos (-SOH).

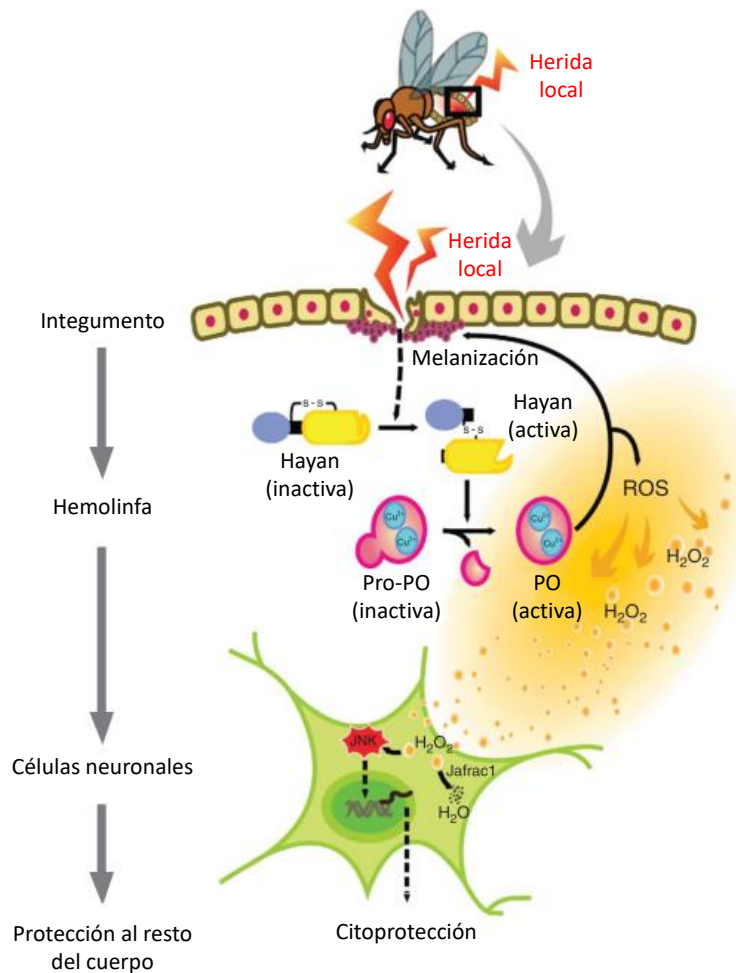


Figura I.4. Modelo de la respuesta sistémica a la herida redox dependiente. Adaptado de Lee *et al.*, 2012 (246).

I.4.2.2. La respuesta inmune celular

Drosophila contrarresta infecciones sistémicas a través de la acción de los hemocitos, considerados como los equivalentes de las células sanguíneas de mamíferos. Existen tres tipos de hemocitos: los plasmocitos, constituyen el grupo más abundante, son células similares a los monocitos y están involucrados en la fagocitosis de cuerpos apoptóticos y patógenos; las células cristal, no son fagocíticas pero sí requeridas para la melanización; y los lamelocitos, involucrados en la encapsulación de cuerpos extraños demasiado grandes para ser fagocitados. Los lamelocitos no se forman en condiciones normales, sino que lo hacen en respuesta a desafíos inmunes específicos. Las moscas adultas sólo poseen plasmocitos (251).

Fagocitosis

La función principal de los plasmocitos es fagocitar microbios, incluyendo virus, bacterias, y hongos, así como otras partículas foráneas y componentes celulares dañados. La ablación genética de la fagocitosis a través de la inducción específica de la apoptosis sobre los hemocitos, o la saturación mecánica del proceso mediada por la microinyección de perlas de látex no degradables causan que las moscas se tornen más susceptibles a procesos infectivos (264, 265). Los microbios son reconocidos por receptores específicos y luego internalizados mediante la modulación y reorganización del citoesqueleto. Varias proteínas han sido identificadas como receptores fagocíticos en *Drosophila*. El gen *eater* codifica para un receptor del tipo *scavenger*; su silenciamiento génico provocó una disminución en la unión e internalización de células bacterianas en líneas de cultivo celular. Por otra parte, la mutante nula *eater* tiene una susceptibilidad incrementada a los microbios. Las bacterias Gram negativas también pueden ser fagocitadas a través de PGRP-LC, uno de los receptores de la vía IMD (264–266).

Encapsulación

Los lamelocitos larvales forman una capsula multilaminar alrededor de huevos parasitoides y partículas extrañas, que luego se ennegrece debido a la melanización. Eventualmente, dentro de la cápsula, el invasor es eliminado gracias a la producción local de productos citotóxicos como ROS e intermediarios de la cascada de melanización (249).

Coagulación

La coagulación de la hemolinfa es un proceso crítico para sanar rápidamente la herida luego de una lesión y regenerar la barrera contra la infección. Ha sido esencialmente estudiada en larvas. El coágulo formado está compuesto por fibras entrecruzadas. El proceso inmoviliza tanto a los hemocitos como a los patógenos invasores, promoviendo la destrucción de estos últimos (249).

Melanización.

La melanización es el proceso de deposición de melanina que ocurre tanto durante la encapsulación como en la coagulación. Comienza con el sensado de heridas tegumentarias o el reconocimiento de microbios a través de receptores como las GNBPs y PGRP-LE. Posteriormente, se dispara una cascada de señalización en la cual se activan secuencialmente múltiples serina proteasas, y subsecuentemente se cliva la pro-PO en su forma enzimáticamente activa, PO. La PO es una enzima clave en la formación de melanina, catalizando la oxidación de mono y difenoles a ortoquinonas. La melanina está constituida de heteropolímeros derivados de ortoquinona. Debido a la propensión de las quinonas por procesos de óxido-reducción, estos precursores de melanina son fuentes de generación de ROS (267–270).

I.4.2.3. La respuesta inmune epitelial

Los distintos epitelios como los sub-cuticulares, traqueales y del tracto digestivo son los primeros en entrar en contacto con los microbios. Por ello, cuentan tanto con barreras físicas como con mecanismos locales de defensa tales como secreción de AMPs y ROS.

Anatómicamente el intestino de *Drosophila* puede dividirse en intestino anterior, medio y posterior. El sistema digestivo superior es utilizado para la incorporación y almacenamiento del alimento, mientras que el procesamiento y la absorción ocurre en las regiones media y posterior del intestino medio. La presencia de células madres intestinales (ISCs) asegura la homeostasis intestinal al suministrar enterocitos diferenciados. Una característica de los enterocitos es su rápido recambio, en el cual las células apoptóticas son reemplazadas por la proliferación compensatoria de las ISCs. La matriz peritrófica es una estructura acelular que forma una capa de polímeros de quitina y glicoproteínas que reviste el lumen del intestino medio de *Drosophila*. A pesar de las diferencias estructurales, se considera que esta matriz es homóloga a la

capa de mucus del tracto intestinal de mamíferos y protege al epitelio intestinal de alimentos abrasivos y microbios (271).

Las células intestinales deben tolerar a las bacterias comensales a la vez de ser capaces de montar una respuesta vigorosa ante la presencia de patógenos. Una vía importante implicada en la distinción entre estos tipos de microorganismos es la producción de ROS por parte de la oxidasa de membrana dual Duox. En presencia de bacterias comensales y ausencia de especies patogénicas, bajos niveles de activación de la vía IMD del sistema inmune innato inducen una retroalimentación negativa de la vía Duox, tanto a nivel de expresión como de actividad, resultando en un nivel basal bajo de ROS. Por el contrario, cuando el sistema inmune del hospedador detecta bacterias patógenas, la expresión y actividad de los componentes de la vía Duox aumentan, lo que conlleva a la destrucción de la bacteria (272). Recientemente se ha reportado que el uracilo -liberado en mayor cantidad por bacterias patogénicas- sería la señal que permitiría al sistema Duox discernir entre patógenos y simbioses (271). La vía Duox retroalimenta las vías que controlan la apoptosis y a la proliferación de células madres para asegurar la reparación del daño celular generado por la exposición a ROS (272).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Como se refirió en la Introducción, en humanos, *Sma* es un patógeno oportunista, aislándose como agente etiológico de un vasto espectro de infecciones, con creciente incidencia en ámbitos extra e intra-hospitalarios. *Sma* produce numerosas exoproteínas tales como hemolisina, proteasas, fosfolipasa, quitinasas, entre otras, y además es capaz de secretar OMVs al medio de cultivo. Si bien se predice un rol general en la patogénesis para todos estos factores, la relevancia de cada uno, sus mecanismos moleculares de acción, y las vías regulatorias que gobiernan su expresión permanecen pobremente caracterizados.

En este contexto, como **Objetivo Principal** de este Trabajo de Tesis, nos proponemos:

- Contribuir a ampliar el conocimiento sobre los factores de patogénesis de *Sma*, así como también sobre los mecanismos regulatorios que gobiernan su expresión.

Para tal fin, planteamos los siguientes **Objetivos Específicos**:

- Identificar y analizar el proteoma de las OMVs.
- Estudiar la interacción de las OMVs con líneas celulares de mamífero.
- Estudiar el efecto de las OMVs en *Drosophila melanogaster*, especialmente atendiendo a su interacción con el sistema inmune del insecto.
- Identificar las señales y mecanismos regulatorios que modulan la expresión de las metaloproteasas de *Sma*, en particular, PrtA.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Cepas bacterianas, líneas celulares, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas, líneas celulares, y líneas de insectos utilizadas en esta Tesis se describen en las Tablas III.1, III.2 y III.3, respectivamente. Los plásmidos y los oligonucleótidos se detallan en las tablas III.4 y III.5.

Tabla III.1. Cepas bacterianas y líneas celulares.

Cepa bacteriana	Genotipo y comentarios	Referencia
<i>Serratia marcescens (Sma)</i>		
RM66262	salvaje (<i>wt</i>); aislamiento clínico	(273, 274)
<i>lipB</i>	RM66262 <i>lipB</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Stock del laboratorio
<i>prtA</i>	RM66262 <i>prtA</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>prtA-3xFLAG</i>	RM66262 <i>prtA-3xFLAG</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>prtA-6xHis</i>	RM66262 <i>prtA-6xHis</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>cpxR</i>	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Stock del laboratorio
<i>flhD</i>	RM66262 <i>flhD</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Stock del laboratorio
<i>fliA</i>	RM66262 <i>fliA</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(20)
<i>phoP</i>	RM66262 <i>phoP</i> ::pKNOCK-Cm ^R	(22)
<i>ompR</i>	RM66262 <i>ompR</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Stock del laboratorio
<i>rcsB</i>	RM66262 <i>rcsB</i> ::pKNOCK-Gm ^R	(48)
<i>rssB</i>	RM66262 <i>rssB</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>fur</i>	RM66262 <i>fur</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>slpE</i>	RM66262 <i>slpE</i> ::pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
<i>ompA</i>	RM66262 <i>ompA</i> ::pKNG101-Sm ^R	Este trabajo
<i>ompA</i> ::4-Cys	RM66262 <i>ompA</i> ::4-Cys	Este trabajo
<i>wt</i> /pBB2	RM66262/pBB2; Km ^R	Stock del laboratorio
<i>prtA</i> /pBB2	RM66262 <i>prtA</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pBB2; Km ^R	Este trabajo
<i>prtA</i> /pBB2:: <i>prtA</i>	RM66262 <i>prtA</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pBB2:: <i>prtA</i> ; Km ^R	Este trabajo
<i>wt</i> /pBB5	RM66262/pBB5; Gm ^R	Stock del laboratorio
<i>cpxR</i> /pBB5	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pBB5; Gm ^R	Este trabajo

<i>cpxR</i> /pBB5:: <i>cpxR</i>	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pBB5:: <i>cpxR</i> ; Gm ^R	Este trabajo
<i>wt</i> /pSU36	RM66262/pSU36; Km ^R	Este trabajo
<i>wt</i> /pSU36:: <i>nlpE</i>	RM66262/pSU36:: <i>nlpE</i> ; Km ^R	Este trabajo
<i>cpxR</i> /pSU36	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pSU36; Km ^R	Este trabajo
<i>cpxR</i> /pSU36:: <i>nlpE</i>	RM66262 <i>cpxR</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pSU36:: <i>nlpE</i> ; Km ^R	Este trabajo
<i>prtA</i> /pSU36	RM66262 <i>prtA</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pSU36	Este trabajo
<i>prtA</i> /pSU36:: <i>nlpE</i>	RM66262 <i>prtA</i> ::pKNOCK-Cm ^R /pSU36:: <i>nlpE</i> ; Km ^R	Este trabajo
Db10	salvaje (<i>wt</i>); aislamiento entomopatogénico	(275)
Db10 <i>prtA</i>	Db10 <i>prtA</i> :: pKNG101-Sm ^R	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	<i>endA1 gyrA96</i> (Nal ^R) <i>thi-1 recA1 relA1 lac</i> [F' <i>proAB, lacI</i> ^f Z, ΔM15::Tn10]; Tc ^R	(276)
SM10 λpir	<i>thi-J thr leu tonA lacY 61lic recA</i> ::RP4-2-Tc::Mu; λpir; Km ^R .	(277)
One Shot [®] TOP10	F-, <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galE15 galK16 rpsL endA1</i> ; Sm ^R	Invitrogen™
M15/pREP4	F-, Φ80Δ <i>lacM15 thi lac mtl recA</i> +; <i>placI</i> ; Km ^R	Qiagen
HB101/pRK2013	F- <i>mcrB mrr hsdS20</i> (<i>rB- mB-</i>) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>glnV44</i> λ-; genes <i>mob</i> ; Km ^R	(278)

Tabla III.2. Líneas celulares.

Línea celular	Características relevantes	Referencia
CHO	Células epiteliales provenientes de ovario de hámster	(279)
CHO-EGFP-LC3	Células CHO transfectadas establemente con pEGFP::lc3	(279)

Tabla III.3. Líneas de insectos.

Línea de insecto	Características relevantes	Referencia
<i>Drosophila melanogaster</i>		
A5001	Línea salvaje	(25)
A5001/ <i>Imd</i>	Mutante homocigota para <i>Imd</i> , en fondo A5001	(280)
A5001/ <i>Myd88</i>	Mutante homocigota para <i>Myd88</i> , en fondo A5001	(281)
CnBw	Línea salvaje	(282)
CnBw/ <i>Myd88</i>	Mutante homocigota para <i>Myd88</i> , en fondo CnBw	(281)
CnBw/ <i>Kenny</i>	Mutante homocigota para <i>IKKy</i> , en fondo CnBw	(282)
W1118	Línea salvaje	(246)
W1118/ <i>Hayan</i>	Mutante homocigota para <i>Hayan</i> , en fondo W1118	(246)

Tabla III.4. Plásmidos.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pRK2013	Plásmido auxiliar (<i>helper</i>), utilizado para la movilización de plásmidos no autotransmisibles	(278)
pGEM-T [®] easy	Vector de clonado de productos de PCR, linealizado, con T colgantes en los extremos 3', alto número de copias, Amp ^R	Promega
pGEM-T [®] easy:: <i>prtA</i>	Gen <i>prtA</i> y las 500 pb flanqueantes (corriente arriba y abajo) clonados en pGEM-T [®] easy	Este trabajo
pGEM-T [®] easy:: <i>PprtA</i>	Promotor putativo de <i>prtA</i> clonado en pGEM-T [®] easy	Este trabajo
pGEM-T [®] easy:: <i>cpxR</i>	Gen <i>cpxR</i> clonado en pGEM-T [®] easy	Este trabajo
pJET1.2/blunt	Vector de clonado de productos de PCR con extremos romos, alto número de copias, Amp ^R	Thermo
pJET1.2:: <i>prtA-Strep-tag</i>	Fragmento interno de <i>prtA</i> de <i>Sma</i> Db10 modificado por SOE-PCR, clonado en pJET1.2/blunt	Este trabajo
pBBR1-MCS2 (pBB2)	Vector de clonado de amplio rango de hospedador, movilizable y de mediano número de copias, Km ^R	(283)

pBB2:: <i>prtA</i>	Gen <i>prtA</i> completo, clonado en pBBR1-MCS2	Este trabajo
pBBR1-MCS5 (pBB5)	Vector de clonado de amplio rango de hospedador, movilizable y de mediano número de copias, Gm ^R	(283)
pBB5:: <i>cpxR</i>	Gen <i>cpxR</i> completo, clonado en pBBR1-MCS5	Este trabajo
pBB5:: <i>slpE-inhE</i>	Genes <i>slpE</i> e inhibidor putativo (<i>inhE</i>), clonados en pBBR1-MCS5	Este trabajo
pQE32	Ori ColE1, Amp ^R , P _{T5-lac} , N-His	Qiagen
pQE32:: <i>cpxR</i>	Gen <i>cpxR</i> completo, clonado en pQE32	Este trabajo
pPROBE-NT [ASV]	Vector reportero, gen <i>gfp</i> carente de región promotora, Km ^R	(284)
pPROBE:: <i>P_{prtA}-gfp</i> [ASV]	Región promotora putativa de <i>prtA</i> , clonada en pPROBE-NT [ASV]	Este trabajo
pKNOCK-Cm	Vector suicida (ori R6K), movilizable	(285)
pKNOCK-Cm:: <i>prtA</i>	Fragmento interno de <i>prtA</i> , clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNOCK-Cm:: <i>prtA</i> -3xFLAG	Fragmento C-terminal de <i>prtA</i> en fase con epítotope 3xFLAG, clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNOCK-Cm:: <i>prtA</i> -6xHis	Fragmento C-terminal de <i>prtA</i> en fase con epítotope 6xHis, clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNOCK-Cm:: <i>rssB</i>	Fragmento interno de <i>rssB</i> clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNOCK-Cm:: <i>fur</i>	Fragmento interno de <i>fur</i> clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNOCK-Cm:: <i>slpE</i>	Fragmento interno de <i>slpE</i> clonado en pKNOCK-Cm ^R	Este trabajo
pKNG101	Vector suicida (oriR6K), movilizable (mobRK2), con marcador de contraselección (<i>sacB</i>), Sm ^R	(286)
pKNG101:: <i>prtA</i> -Strep-tag	Fragmento interno de <i>prtA</i> de <i>Sma</i> Db10 modificado por SOE-PCR, clonado en pKNG101	Este trabajo
pKNG101:: <i>ompA</i> -4Cys	Fragmento interno de <i>ompA</i> modificado por SOE-PCR, clonado en pKNG101	Este trabajo

Tabla III.5. Oligonucleótidos.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
prtA left Fw	AGGCTCGCTGCCGTTAG
prtA right Rv	CCTGATCGTGCGTTCGC
prtA ATG Fw	GGGGTACCGTTATGTCTATCTGTCTG
prtA Rv	CCCAAGCTTTTACACGATAAAGTCAGTG
prtA C-ter Fw	GCTCTAGAGAGAAATCGTTCTCCGATGTG
prtA C-ter Rv 3xFLAG	CCGCTCGAGTTACTATTTATCGTCGTCATCTTTGTAGTCGATATC ATGATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTCCACGATAAA GTCAGTGGCGAC
prtA C-ter Rv 6xHis	CCGCTCGAGTTACTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCACGATAAAG TCAGTGGCGAC
prtA loop 1 left Fw	GCTCTAGAGAGGTTTCATTAACCGTGG
prtA loop 1 left Rv	CGCTTTTTCAAACGCGGATGGCTCCACGCAGAGAACTTATAAT CCGGG
prtA loop 1 right Fw	GCGTGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAAGCGTCCACTAACGTCG CCGGC
prtA loop 1 right Rv	CGGGATCCGTGACGTCGCGGTAGGTC
prom prtA FW	CGGAATTCAGGCTCGCCGCCGATAG
prom prtA RV	CGAAGCTTAACCTCCCCGTAAGCCAG
prtA RT-Fw	TTACCCGTGAGAACCAAACC
prtA RT-Rv	TGTAGTTGCCGAAGGTGATG
slpC RT-Fw	GTTTCAGATCTGTTGCTGAGG
slpC RT-Rv	ATGGTGCTTTTCAGGTCG
slpD RT-Fw	GGGTAAAATCCGCGATAAC
slpD RT-Rv	GCGCGATGATTGATATCG
slpE RT-Fw	AAACCTGGAATGGCGTGAC
slpE RT-Rv	CAAGGCATACGCTTGTCCTG
slpE ATG Fw	GGGGTACCATGGGTAATACCATGAATGG
slpE inhE RV	GGACTAGTCGTGATAACCGCGTTCAG
fur Fw	GCTCTAGAGCGACTCAAAATCCTGGAAG

fur Rv	CCGCTCGAGCTGCTTGGCGATATCACG
fur ORF Rv	CCACTAGTTTATTTCTTGTCTGCAGC
rssB Fw	GCTCTAGAGATGCTGTTGGATCTCACG
rssB Rv	CCGCTCGAGCGATGTGCACTTCCAGCG
cpxR Fw	ACGGGATCCATATGAACAAGATTCTGTTAG
cpxR Rv	AGCAAGCTTTCATGTTGCAGATACCATC
cpxP RT-Fw	TGGAAGCCATGCATAAACTG
cpxP RT-Rv	TACGCTGCTGATGTTTCTGG
dsbA RT-Fw	GGCATGGTGATGGCATTACG
dsbA RT-Rv	GCCTGAGTCAGCTGTTTG
16S Fw	AAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
16S Rv	ATGGTGTGACGGGCGGTGTG
nuclease Fw	GCTCTAGAGGCAAGACGCGCAACTGG
nuclease Rv	CCGCTCGAGGAAATCGGCGCCCTTCGG
ompA left Fw loop3	GCTCTAGAACTGGCAGGTTTCGCTAC
ompA left Rv ARS tag loop 3	GTAGCAGCAGCCCCGGGCAGCAGTTAGCTTTGGAATCTGC
ompA right Fw ARS tag loop 3	AACTGCTGCCCCGGGCTGCTGCTACGGCCGTAAGTGGTCAG
ompA right RV loop 3	GGACTAGTGATCCAGAGCCTGTTGGC
FLASH check Rv	GTACGGCCGTAGCAGCAG
pKNOCK ori Fw	TAAGGTTTAACGGTTGTGG
pKNOCK ori Rv	CTTACGTGCCGATCAACG
strAB Rv check 1	TGATGAGAATATCGTCGGAG
Drosomycin Fw	CGTGAGAACCTTTTCCAATATGATG
Drosomycin Rv	TCCCAGGACCACCAGCAT
Diptericin Fw	GCTGCGCAATCGCTTCTACT
Diptericin Rv	TGGTGGAGTGGGCTTCATG
Rp49 Fw	GACGCTTCAAGGGACAGTATCTG
Rp49 Rv	AAACGCGGTTCTGCATGAG

III.2. Medios de cultivo

III.2.1. Medios de cultivo bacterianos y antibióticos

Las bacterias fueron cultivadas en el medio de cultivo comercial Luria-Bertani (LB, Difco): peptona de carne 10 g/l; de extracto de levadura 5 g/l; NaCl 10 g/l. Para los experimentos utilizando medios de cultivo a pH 5,0 u 8,0, se preparó LB comercial (Difco) suplementado con MES 100 mM (Sigma) y MOPS 50 mM (Sigma), y se llevó al pH indicado mediante el agregado de NaOH (Sigma).

En el caso de los experimentos utilizando medios de osmolaridad variable, en primer lugar se preparó medio de cultivo SLB: peptona de carne 10 g/l (Sigma); extracto de levadura 5 g/l (Merck). A partir del mismo, se añadió NaCl 10 g/l (Sigma) para obtener medio LB, o bien NaCl 26 g/l para obtener medio Na-LB.

Alternativamente, las bacterias fueron cultivadas en el medio mínimo de cultivo comercial M9 (M9 minimal salts 5X, Difco): Na₂HPO₄ 33,9 g/l; KH₂PO₄ 15g/l; NaCl 2.5g/l, NH₄Cl 5g/L. Las sales concentradas fueron diluídas y suplementadas con MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, y –según se indique- glucosa 0,4 % (p/v) (Sigma) o sacarosa 15% (p/v) (Sigma) como fuente de carbono.

Para la preparación de medios sólidos, se agregó agar en una concentración final de 15 g/l. Los antibióticos empleados para los cultivos bacterianos fueron: ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml), kanamicina (50 µg/ml), tetracilina (15 µg /ml), estreptomycin (100 µg/ml) y gentamicina (15 µg/ml).

Las cepas de *Sma* se crecieron a la temperatura indicada con agitación. Las cepas de *E. coli* se crecieron a 30°C o 37°C con agitación, según cada caso.

III.2.2. Medios de cultivo celular

Las células epiteliales CHO (*C*hinese *h*amster *o*vary) y CHO-EGFP-LC3 fueron cultivadas en medio α-MEM (Invitrogen). Todos los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (Natocor) y antibiótico-antimicótico (penicilina 10 mg/ml; estreptomycin 10 µg/ml; anfotericina B 25 µg/ml). Las células fueron mantenidas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%.

III.2.3. Medios de crecimiento de *D. melanogaster*

Todos los animales se mantuvieron en medio harina de maíz-agar a 25°C con un 65% de humedad. 25 litros de este medio se componen de: harina de maíz (Priméal)

1,2 kg; cristales de azúcar 1,2 kg (Erstein); levadura 300 g (Bio Springer), antifúngico moldex 100 g/400 ml H₂O milli-Q; agar-agar 20 g (Sobigel), y H₂O hasta completar volumen.

III.3. Técnicas moleculares de ácidos nucleicos

III.3.1. Preparación de ADN cromosomal

El ADN cromosomal se preparó a partir de células de *Sma* RM66262 o *Sma* Db10, o mutantes derivadas de alguna de estas cepas parentales, según se indique. Se centrifugaron 3 ml de un cultivo saturado de células crecidas en medio LB a 37 °C con agitación constante. Las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 2,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM; NaCl 150 mM y luego se repitió la centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en 2,5 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 25 mM. Luego se agregaron 275 µl de lisozima 2 mg/ml (Sigma), y se incubó 20 min a 37°C. Se agregaron 300 µl de una solución de Sarkosyl 10% (p/v) (Sigma) y 30 µl de una solución de proteinasa K 1 mg/ml (Invitrogen), y se incubó a 55°C durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con volúmenes iguales de fenol equilibrado con Tris-HCl 100 mM pH 8,0 (para la primera y segunda extracción); y con cloroformo: fenol en proporción 1:1 (v/v) (para la tercera extracción), conservando siempre la fase acuosa. Se centrifugó la mezcla a 10000 X *g* durante 5 min, se recuperó la fase acuosa que contiene al ADN cromosomal y se le agregaron 1/10 partes en volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 15000 X *g* durante 20 min. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de etanol 80% (v/v) (Merck), se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en 300 µl de H₂O milli-Q. La concentración de ADN fue determinada midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm, según la siguiente fórmula:

$$1 \text{ unidad de Abs}_{260} = 50 \text{ µg de ADN/ml de solución (276).}$$

La calidad de la preparación se evaluó a través del cociente $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$. Un valor entre 1,7 y 2,0 indica que se halla libre de proteínas y fenol (276). También se analizó el ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, como se indica en la sección III.3.9.

III.3.2. Preparación de ADN bacteriano plasmídico

La extracción de plásmidos a partir de células de *E. coli*, previamente transformadas, se realizó creciendo las bacterias durante toda la noche a 37°C, con agitación constante en 3 ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente. El cultivo se centrifugó y las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 350 µl de solución STET: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 50 mM pH 8,0; sacarosa 8% (p/v); Tritón X-100 5% (v/v) (Sigma). Luego se adicionaron 10 µl de una solución conteniendo: Tris-HCl 50 mM pH 8,0; lisozima 10 mg/ml; ARNasa 1 mg/ml (Sigma); y glicerol 50% (v/v). La mezcla se incubó 1 min a 100°C y, posteriormente, se centrifugó 10 min a 15000 X g. Con un palillo estéril se removi6 el pellet y se conserv6 el sobrenadante que contenía el ADN plasmídico. Se realizó una extracción con 1 volumen de la mezcla fenol:cloroformo en relación 1:1 (v/v) y se recuper6 la fase acuosa. El ADN se precipitó agregando 1/10 partes en volumen de acetato de amonio 5 M y 1 volumen de isopropanol. Se incubó la mezcla a -20°C durante 30 min. Y se centrifugó por 10 min a 15000 X g. El ADN precipitado se lavó con 1 ml de etanol 80% (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µl de H₂O milli-Q y se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización. Alternativamente, para obtener ADN plasmídico de mejor calidad, se utilizó el kit comercial GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3.3. Preparación de ARN

a) Extracción de ARN total a partir de insectos de *D. melanogaster*

Luego de seis horas del tratamiento correspondiente, grupos de 5 moscas hembras adultas de la línea A5001 fueron transferidas a microtubos de 2 ml (Starsted) conteniendo cinco perlas de cerámica de 14 mm (Dominique Dutcher) en 200 µl de reactivo Trisol-RT. Luego, los insectos fueron triturados mediante la utilización de un homogeneizador de tejidos Precellys 24 (Bertin Technologies). El ARN total se extrajo utilizando el kit NucleoSpin 96 RNA (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante.

b) Extracción de ARN total a partir de cultivos bacterianos de *Sma*

En primer lugar, se realizó una dilución 1/100 de cultivos saturados de la cepa de interés en 10 ml de medio LB. Las bacterias se cultivaron a 30° o 37°C (según se indique) con agitación durante 16 horas. Posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se

adicionaron 250 µl de una mezcla fría de etanol:fenol pH 5,5 95:5 (v:v) y se incubó en hielo durante 20 min. Luego, las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000 X *g* durante 5 min, resuspendidas en buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 7,0; EDTA 1mM) y nuevamente centrifugadas a 6000 X *g* durante 5 min. Los siguientes pasos de extracción se realizaron usando el kit comercial Promega SV Total RNA Isolation Kit (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia de una alícuota a 260 nm, según la fórmula: 1 unidad de Abs260nm = 40 µg de ARN/ml de solución.

Todas las preparaciones de ARN que fueron utilizadas en los ensayos de RT-PCR presentaron un valor del cociente (Abs260nm/Abs280nm) entre 1,8 y 2,0, lo que indica que se hallaban esencialmente libres de proteínas y fenol (276). Además se analizó el ARN total obtenido mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), como se indica en la sección III.3.9.

III.3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de fragmentos por PCR se siguió un protocolo básico consistente en la desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 4 min, luego una iteración de 30 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C, anillado de los cebadores entre 50 y 60°C (dependiendo de las características de los oligonucleótidos) y elongación del ADN a 72°C o 68°C (según la ADN polimerasa utilizada), para cada ciclo. Los tiempos de desnaturalización y anillado fueron de 30 segundos cada uno, y los de elongación dependieron de la longitud de los productos a amplificar (se calculó 1 min por kpb). Finalmente, se incluyó una etapa de extensión a 72°C o 68 °C durante 5 min. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient. El volumen final de las reacciones fue de 50 µl, conteniendo solución 1X de amplificación comercial suplementada con: MgCl₂ 2,5 mM; desoxinucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP 0,25 mM de cada uno (Invitrogen); ADN genómico 500 ng; oligonucleótidos directo y reverso 10 pmoles cada uno; y 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen) o de *Pfx50* ADN polimerasa (Invitrogen). Los oligonucleótidos se describen en la Tabla III.5. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa, como se indica en la sección III.3.9.

III.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa a partir de colonias (Colony-PCR)

La reacción de amplificación de ADN se realizó a partir de una colonia bacteriana inoculada directamente en un volumen final de 20 μ l, conteniendo solución 1X de amplificación comercial suplementada con: $MgCl_2$ 2,5 mM; desoxinucleósidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP 0,25 mM de cada uno; oligonucleótidos directo y reverso 10 pmoles cada uno; y Taq ADN polimerasa 1 U. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Esta técnica se utilizó para la búsqueda de la presencia de distintos fragmentos de interés en las cepas de *E. coli* transformadas. Los oligonucleótidos se describen en la Tabla III.5. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa como se indica en la sección III.3.9.

III.3.6. Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa (qPCR)

a) RT-PCR y qPCR a partir de ARN de *D. melanogaster*

La reacción de transcripción reversa se efectuó utilizando el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN copia fueron diluidas 1/20 en H_2O milli-Q. La cuantificación de la expresión de los genes de péptidos microbicidas se realizó por qPCR utilizando SYBR Green (Bio-Rad), que se intercala en fragmentos de ADN de doble cadena, como se describió previamente en (287). Se utilizaron los pares de cebadores dipterin Fw-Rv; drosomycin Fw-Rv. Se incluyó el gen *Rp49* como gen normalizador, utilizando los cebadores rp49 Fw y rp49 Rv.

b) RT-PCR y qPCR a partir de ARN de *Sma*

La síntesis de ADN copia se realizó utilizando oligonucleótidos aleatorios; ARN total 2-4 μ g; y retrotranscriptasa Superscript II™ 1 U (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN copia fueron diluidas 1/10 en H_2O milli-Q. 5 μ l de cada una de estas diluciones se utilizaron como molde para las reacciones de qPCR, usando los pares de cebadores: prtA Fw-Rv; cpxP Fw-Rv; dsbA Fw-Rv; según se indique. Se incluyó el gen 16S como gen normalizador (combinando los cebadores 16S Fw y 16S Rv). En todos los casos, el fragmento amplificado fue de alrededor de aproximadamente 250 pb. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en presencia del colorante SYBR Green (Roche), y se monitorearon en tiempo real con el termociclador Mastercycler ep Realplex RT-PCR (Eppendorf).

Para todas las qPCRs, la expresión relativa se calculó utilizando los valores de ciclo umbral (Ct) obtenidos para cada transcripto de la siguiente manera: expresión relativa = $2^{-\Delta\Delta Ct}$; siendo $\Delta Ct = Ct$ transcripto de interés – Ct gen normalizador; y $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ condición experimental – ΔCt condición de referencia.

III.3.7. Mutagénesis dirigida mediante la técnica de SOE-PCR

Para la construcción de la cepa etiquetada de *Sma ompA::4-Cys* (con la etiqueta hexa-aminoacídica CCPGCC en el tercer bucle extracelular de OmpA) fue necesario generar un fragmento de ADN recombinante de 800 pb conteniendo la secuencia codificante para dicho motivo, y flanqueada por regiones de homología con el gen *ompA*. Para ello, aplicamos la técnica denominada SOE-PCR. El término “SOE” proviene del inglés *splicing overlap extension*, es decir, empalme por extensión de la superposición. En primer lugar, se realizaron dos reacciones convencionales de PCR, denominadas PCR I y PCR II (figura III.1.A). La PCR I consistió en la amplificación de un fragmento de 400 pb usando el cebador directo *ompA* left FW loop 3 y el cebador reverso *ompA* left RV ARS Tag loop 3 (el cual codifica la secuencia de la etiqueta CCPGCC en su extremo 5') utilizando ADN genómico silvestre de *Sma* RM66262 como molde. Así, se obtuvo un fragmento de ADN conteniendo parte de la secuencia codificante de *ompA* más 18 pb extra correspondientes a la etiqueta. De modo análogo, la PCR II se llevó a cabo con los oligonucleótidos *ompA* right FW ARS Tag loop 3 (conteniendo la secuencia codificante de CCPGCC en su extremo 5') y *ompA* right RV loop 3. Se generó entonces un segundo producto de PCR, con complementariedad al fragmento PCR I en la región codificante de CCPGCC. Ambos productos de PCR fueron purificados y cuantificados mediante absorbancia a 260 nm, utilizando 150 ng de cada uno de ellos como moldes para el próximo paso. La primera etapa de la SOE-PCR transcurrió sin el agregado de oligonucleótidos, ya que los fragmentos hacen las veces de cebadores entre sí (figura III.1.B). Esta etapa consistió en una etapa de desnaturalización inicial del ADN a 94°C durante 4 min, seguida de una iteración de 15 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C durante 30 segundos, anillado de los productos a 60°C durante 30 segundos y elongación del ADN durante 40 segundos a 68°C utilizando 2,5 U de la ADN polimerasa Pfx50 (Invitrogen), para cada ciclo. Posteriormente, se pausó la reacción, y se procedió a la segunda etapa (figura III.1.C), en donde se agregaron 8 nmoles de los oligonucleótidos externos *ompA* left FW loop 3 y *ompA* right RV loop 3 a la mezcla de reacción, y se ejecutó una iteración de 15 ciclos compuestos por desnaturalización del ADN a 94°C

durante 30 segundos, anillado de los productos a 60°C durante 30 segundos, y elongación del ADN a 68°C durante 1 min 20 segundos. Finalmente, se amplificó el producto deseado de 800 pb a partir de un gel de agarosa, como se indica en la sección III.3.9.

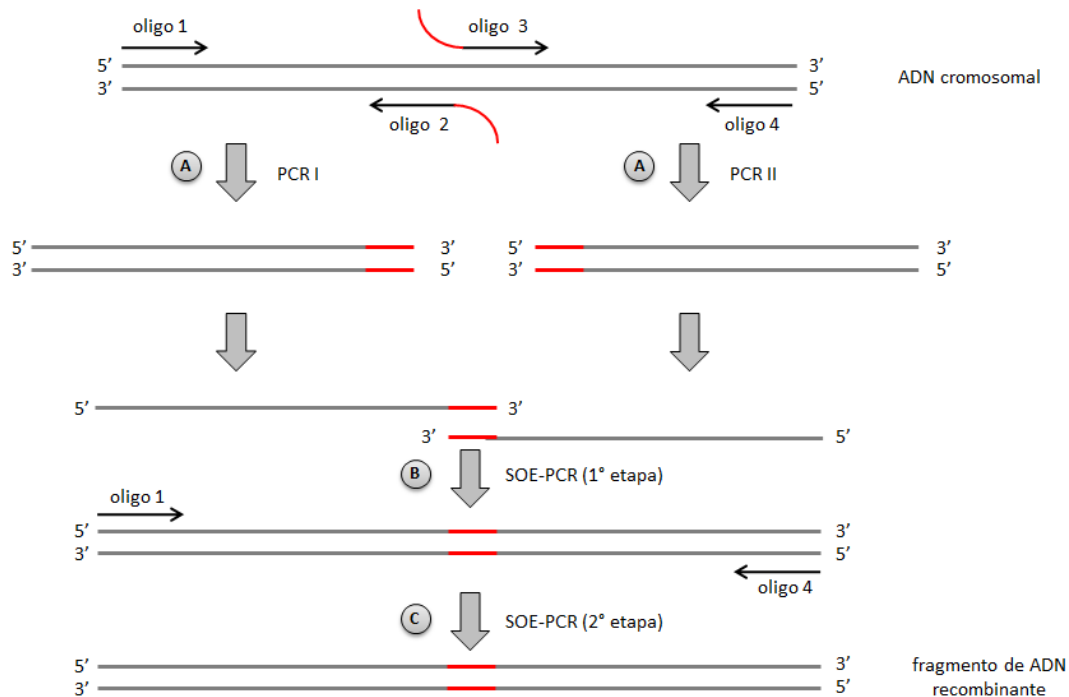


Figura III.1. Esquema general de la SOE-PCR. **A)** A partir del ADN cromosomal de *Sma* RM66262 se amplificaron por PCR dos regiones adyacentes del gen *ompA*, obteniendo los fragmentos denominados PCR I y PCR II. **B)** Posteriormente, en la primera etapa de la SOE-PCR, ambos fragmentos actuaron de cebadores entre sí para generar un producto de empalme de 800 pb conteniendo en el medio la secuencia codificante para el motivo CCPGCC (en rojo). **C)** En una segunda etapa de la reacción, se agregaron los cebadores externos para amplificar el producto de empalme deseado. Oligo 1: *ompA* left Fw loop3; oligo 2: *ompA* left Rv ARS Tag loop 3; oligo 3: *ompA* right Fw ARS tag loop3; oligo 4: *ompA* right Rv loop 3. Una estrategia análoga se aplicó para generar un fragmento recombinante conteniendo la etiqueta *Strep*-tag flanqueada por secuencia codificante del gen *prtA*. En este caso, los oligonucleótidos utilizados fueron: oligo 1, *prtA* loop 1 left Fw; oligo 2, *prtA* loop 1 left Rv; oligo 3, *prtA* loop 1 right Fw; oligo 4, *prtA* loop 1 right Rv.

III.3.8. Adenilación terminal sobre fragmentos de ADN romos

Se utilizó este protocolo con el objeto de añadir adeninas terminales 3' a los extremos romos de un fragmento de ADN previamente amplificados por una ADN polimerasa de alta fidelidad, como ser Pfx50. En primer lugar, se purificó el fragmento de PCR mediante la tecnología de adsorción en columna comercial GFX (GE Life Sciences), siguiendo las indicaciones del fabricante. La reacción de adenilación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl conteniendo: 25-35 µl del ADN purificado, solución 1X de amplificación comercial, dATP 1mM 10 µl; Taq ADN polimerasa 1 U. La mezcla de reacción se incubó a 72°C durante 20 min en un termociclador Eppendorf

Mastercycle Gradient. Finalmente, el ADN modificado fue purificado nuevamente mediante el uso de columnas de adsorción comerciales.

III.3.9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

El ADN plasmídico, los fragmentos de restricción enzimática, y productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de distinta concentración. Se utilizó el sistema de tipo submarino (276). La solución reguladora TBE 0,5X (Tris base 45 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1mM) se utilizó como solución de electroforesis y para la preparación de geles. A estos últimos se les agregó el agente intercalante bromuro de etidio en una concentración de 0,3 µg/ml antes de su gelificación. Previo a la siembra, las muestras se mezclaron con solución de siembra compuesta por: azul de bromofenol 0,025% (p/v); xilencianol 0,025% (p/v); y glicerol 30% (v/v), en una proporción 5:1 en volumen de muestra: solución de siembra. Como marcador de peso molecular se utilizó 1Kb DNA Ladder (GenBiotech). La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 180 V y – una vez finalizada- los fragmentos de ADN se detectaron empleando el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad), utilizando el modo de iluminación *Trans-UV*, mediante el cual se fotografiaron los geles.

III.3.10. Purificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR, o luego de la digestión con enzimas de restricción, fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante la tecnología de adsorción en columna provista por el kit comercial GFX (GE Life Sciences), siguiendo las indicaciones del fabricante. Alternativamente, se utilizó el mismo kit comercial para purificar fragmentos de ADN directamente a partir de mezclas de reacción de PCR.

III.3.11. Digestión de ADN con enzimas de restricción

Las condiciones de digestión usadas en cada caso fueron las recomendadas por los proveedores de las endonucleasas de restricción. Los volúmenes de reacción variaron entre 20 y 30 µl, utilizándose aproximadamente 1U de enzima por µg de ADN a digerir. El tiempo de incubación a las temperaturas recomendadas fue de 3 horas en la mayoría de los casos, pudiendo ser mayor según la enzima utilizada. El tamaño de los fragmentos de ADN digeridos con las enzimas de restricción se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa, como se describe en la sección III.3.9.

III.3.12. Reacciones de ligación de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l conteniendo: enzima T4 ADN ligasa 2 U (Thermo); solución de reacción comercial 1X; y los fragmentos de ADN a ligar en proporciones molares 1:3, 1:1 o 3:1 de vector:inserto. Las reacciones se incubaron durante toda la noche a una temperatura de 18°C.

III.3.13. Construcciones de plásmidos de expresión y reporteros

La construcción del plásmido pBB2::*prtA* se efectuó amplificando por PCR el gen *prtA* a partir del ADN cromosomal de *Sma* RM66262, utilizando los oligonucleótidos *prtA* ATG Fw y *prtA* Rv. El producto de PCR obtenido fue purificado, cortado con las enzimas de restricción KpnI y HindIII y ligado al vector pBB2 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se introdujo a la cepa *E. coli* One Shot® TOP10 por transformación química; y posteriormente a *Sma prtA* por conjugación tripartita.

Para la construcción del plásmido pBB5::*slpE-inhE*, se amplificaron por PCR los genes *slpE* junto a su inhibidor putativo codificado corriente abajo (*inhE*) a partir del ADN cromosomal de *Sma* RM66262, utilizando los oligonucleótidos *slpE* ATG Fw y *slpE inh* Rv. El producto de PCR obtenido fue purificado, cortado con las enzimas de restricción KpnI y SpeI y ligado al vector pBB5 digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se introdujo a la cepa *E. coli* One Shot® TOP10 por transformación química.

Con el objeto de construir el vector reportero pPROBE::*P_{prtA}-gfp* [ASV], se amplificó por PCR la región promotora putativa del gen *prtA* de *Sma* RM66262 utilizando los cebadores prom *prtA* Fw y prom *prtA* Rv. El producto obtenido fue purificado, clonado en el vector pGEM-T®easy e introducido por transformación química en la cepa *E. coli* One Shot® TOP10. Luego se realizó una restricción con la enzima EcoRI sobre el vector pGEM-T®easy::*P_{prtA}*, liberando el fragmento clonado previamente. Éste se purificó a partir de un gel de agarosa, y se ligó al vector pPROBE-NT [ASV], digerido previamente con EcoRI y tratado con fosfatasa alcalina (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El plásmido resultante se introdujo a la cepa *E. coli* One Shot® TOP10 por transformación química. La orientación del clonado se verificó por PCR utilizando los cebadores M13 Fw y prom *prtA* Rv, obteniendo sólo producto en el caso de los clones con la región promotora en la orientación deseada. Finalmente, el plásmido pPROBE::*P_{prtA}-gfp* [ASV] se movilizó a las cepas de *Sma* salvaje y *cpxR* mediante conjugación tripartita.

Para complementar la mutante *cpxR* se construyó el plásmido pBB5::*cpxR*. En primera lugar, a partir de ADN cromosomal de *Sma* RM66262, se amplificó por PCR el gen *cpxR* utilizando los oligonucleótidos cpxR Fw y cpxR Rv. El producto de PCR purificado fue sometido a un protocolo de adenilación de extremos 3' (detallado en la sección III.3.8) y se ligó al vector comercial pGEM®-T easy dando lugar al plásmido pGEM®-T easy::*cpxR*, el cual se introdujo en la cepa *E. coli* One Shot® TOP10. A partir de una purificación de dicho plásmido, se realizó una doble digestión con las enzimas BamHI y SacI, liberando un fragmento de ADN de 764 pb, el cual fue purificado y ligado al vector pBB5, previamente digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante se movilizó a la cepa *cpxR* por conjugación tripartita, como se describe en la sección III.7.

Para obtener la proteína de fusión CpxR-6xHis, en primera instancia se amplificó el gen *cpxR* por PCR a partir del ADN cromosomal de *Sma* RM66262, utilizando los cebadores cpxR Fw y cpxR Rv. Luego, el fragmento obtenido se clonó entre los sitios BamHI y HindIII del vector de expresión pQE32, obteniendo el plásmido pQE32::*cpxR*-6xHis. Éste finalmente se introdujo por transformación química en la cepa *E. coli* M15/pREP4.

III.3.14. Servicios de secuenciación de ADN

Los fragmentos de ADN amplificados o insertos de ADN clonados en plásmidos fueron secuenciados a través del servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, USA (<http://www2.umaine.edu/dnaseq/services.html>), o alternativamente, a través del servicio de secuenciación de la compañía GATC Biotech AG, Colonia, Alemania (http://www.gatc-biotech.com/shop/en/sanger_products.html).

III.4. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E.coli* se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria y se incubó con agitación permanente a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0,5 y 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó a 6000 X *g* a 4°C. El sedimento celular obtenido se lavó con una solución fría de CaCl₂ 0,1 M. Posteriormente, se volvieron a resuspender las células en CaCl₂ 0,1M y se incubaron en hielo durante 20 min, periodo tras el cual se centrifugaron las células a 6000 X *g* a 4°C durante 5 min. Finalmente, el sedimento celular obtenido se resuspendió en 3 ml

de glicerol 50% (v/v) y 7 mL CaCl_2 0,1M, y se fraccionó en tubos estériles que se guardaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Para la preparación de células electrocompetentes de *Sma*, se inocularon 300 ml de medio LB fresco con 3 ml de un cultivo saturado de la bacteria, y se incubó a 37°C con agitación permanente hasta alcanzar una DO_{600} de entre 0,5 a 0,8. Dicho cultivo se enfrió en hielo durante 20 min y se centrifugó durante 10 min a 4°C y 6000 X g. El sedimento celular obtenido se lavó dos veces con 1 volumen de H_2O destilada estéril fría y una vez con 10 ml de glicerol 10% (v/v). Finalmente, el pellet se resuspendió en 0,6 ml de glicerol 10% (v/v), y se dividió en tubos estériles que fueron almacenados a -80°C hasta el momento de su uso.

III.5. Transformación de células competentes y selección de transformantes

Para la transformación de células de *E. coli*, se agregaron 10 μl de mezcla de ligación, o 1 μl de plásmido, a 100 μl de la suspensión de células competentes preparadas como se indicó en la sección anterior y se incubó en hielo durante 20 min. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico consistente en introducir el tubo eppendorf durante 2 min en un termobloque a 42°C . Tras la transformación, las células se recuperaron añadiendo 1 ml de medio LB fresco sin antibiótico e incubándolas durante 1 hora a 37°C con agitación. Finalmente, las células se sembraron en placas de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformantes, y se incubaron a 37°C durante una noche.

La transformación de células de *Sma* se efectuó a través de un protocolo de electroporación. En primer lugar, se colocaron 40 μl de la suspensión de células competentes preparadas como se indica en la sección anterior en una cubeta de electroporación (Bio-Rad), se agregó 1 μl del plásmido correspondiente y se efectuó un choque eléctrico utilizando un voltaje de 2,5 kV con un electroporador Bio-Rad. Luego se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante. Se concentró por centrifugación. Finalmente, se sembraron 100 μl con espátula de Drigalsky en placas de Petri conteniendo LB-agar suplementado con el antibiótico adecuado para seleccionar las bacterias transformantes, y se incubaron a 37°C durante una noche.

III.6. Conjugación bipartita

Se cultivaron las cepas dadoras de *E. coli* SM10 λpir (transformadas previamente con el plásmido a conjugar) y las cepasceptoras de *Sma* en placas de

LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, con un palillo estéril, se tomaron varias colonias de la cepa dadora y se mezclaron con colonias de la cepa aceptora en una placa de LB-agar sin antibiótico. Dicha placa se incubó a 37°C entre 6 y 18 horas. Finalmente, las bacterias transconjugantes se seleccionaron repicando colonias de la placa anterior en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente al plásmido conjugado, y con un antibiótico resistente para la cepa aceptora: para *Sma* RM66262 se usó ampicilina 100 µg/ml o tetraciclina 4 µg/ml; para *Sma* Db10 se utilizó tetraciclina 12,5 µg/ml. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

III.7. Conjugación tripartita

Se cultivaron la cepa dadora (*E. coli* transformada con el plásmido a conjugar), la cepa aceptora (*Sma*) y una cepa que contiene un plásmido auxiliar (*helper*), *E. coli* HB101/pRK2013, en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37°C. Con un palillo estéril, se tomaron varias colonias de la cepa dadora y la cepa auxiliar y se mezclaron con colonias de la cepa aceptora en una placa de LB-agar sin antibiótico. Dicha placa se incubó se incubó a 37°C entre 6 y 18 horas. Finalmente, las bacterias transconjugantes se seleccionaron repicando colonias de la placa anterior en placas de LB-agar suplementada con el antibiótico correspondiente al plásmido a conjugar y con un antibiótico para el cual la cepa aceptora sea resistente, como se detalló en la sección anterior. La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

III.8. Manipulación genética

III.8.1. Construcción de cepas mutantes en *Sma* RM66626 por inserción del vector suicida pKNOCK

La construcción de las mutantes *prtA*, *rssB*, *fur* y *slpE* en *Sma* RM66262 se realizó a través de la estrategia de mutagénesis insercional dirigida, utilizando el vector suicida pKNOCK-Cm (285) que interrumpió dichos genes.

Para el caso de la cepa *prtA*, utilizando los cebadores *prtA* left Fw y *prtA* right Rv, se amplificó por PCR el gen *prtA* de *Sma* RM66262 incluyendo sus regiones flanqueantes (500 pb corriente arriba del codón de inicio putativo ATG y 500 pb corriente abajo del codón de parada). Se obtuvo un producto de 2556 pb, el cual se separó electroforéticamente, se purificó de gel de agarosa, y se ligó al vector comercial pGEM-T®easy. La construcción pGEM-T®easy::*prtA* se introdujo en una cepa de *E. coli*

XL1-Blue mediante transformación química (figura III.2.A), según se indica en la sección III.5. A partir esta cepa, se purificó ADN plasmídico y se digirió con las enzimas NotI y SmaI en sitios internos al fragmento de ADN clonado, liberando un fragmento de 560 pb, el cual fue separado electroforéticamente, purificado y ligado en los mismos sitios del vector pKNOCK-Cm (figura III.2.B). A continuación, se transformó la cepa *E. coli* SM10 λ pir con la ligación pKNOCK-Cm::*prtA*, y mediante conjugación bipartita en *Sma*, dicho plásmido recombinó en el cromosoma de la bacteria interrumpiendo el gen *prtA* por inserción del vector completo (Figura III.2 C). La cepa mutante fue seleccionada a partir de colonias cloranfenicol resistentes y la mutación cromosomal *prtA*::pKNOCK-Cm fue confirmada por PCR, empleando los oligonucleótidos pKNOCK ori Fw (que hibrida en el origen de replicación del vector pKNOCK-Cm) y *prtA* right Rv.

Para la construcción de la mutante *rssB*, se utilizó el par de cebadores *rssB* Fw-Rv para amplificar –por PCR- un fragmento de 439 pb correspondiente a una región interna del gen *rssB*, usando ADN genómico de *Sma* como molde. Dicho fragmento fue purificado, digerido con las enzimas XhoI y XbaI, y ligado en los mismo sitios del pKNOCK-Cm, obteniendo el plásmido pKNOCK-Cm::*rssB*.

En el caso de la cepa *fur*, se amplificó por PCR –a partir de un molde de ADN genómico de *Sma*- una región interna del gen *fur* compuesta por 298 pb. Se utilizaron para ello los cebadores *fur* Fw y *fur* Rv. El fragmento fue purificado, digerido con las enzimas XhoI y XbaI, y ligado en los mismo sitios del pKNOCK-Cm, obteniendo el plásmido pKNOCK-Cm::*fur*.

Para obtener la mutante *slpE*, en primer lugar se amplificó por PCR el gen *slpE* junto a su inhibidor putativo *inhE*, utilizando como ADN molde el plásmido pBB5::*slpE*-*inhE* (detalles de la construcción en la sección III.3.13), y como cebadores a *slpE* ATG Fw (KpnI) y *slpE* inh Rv (SpeI). El producto de PCR obtenido fue purificado y cortado con las enzimas de restricción EcoRV y ClaI. La doble restricción se corrió en un gel de agarosa al 1,5%, y posteriormente se aisló y purificó una banda de 491 pb, correspondiente a una región interna del gen *slpE*. Dicho fragmento se ligó al vector pKNOCK-Cm previamente digerido con enzimas EcoRV y ClaI, dando lugar al plásmido pKNOCK-Cm::*slpE*.

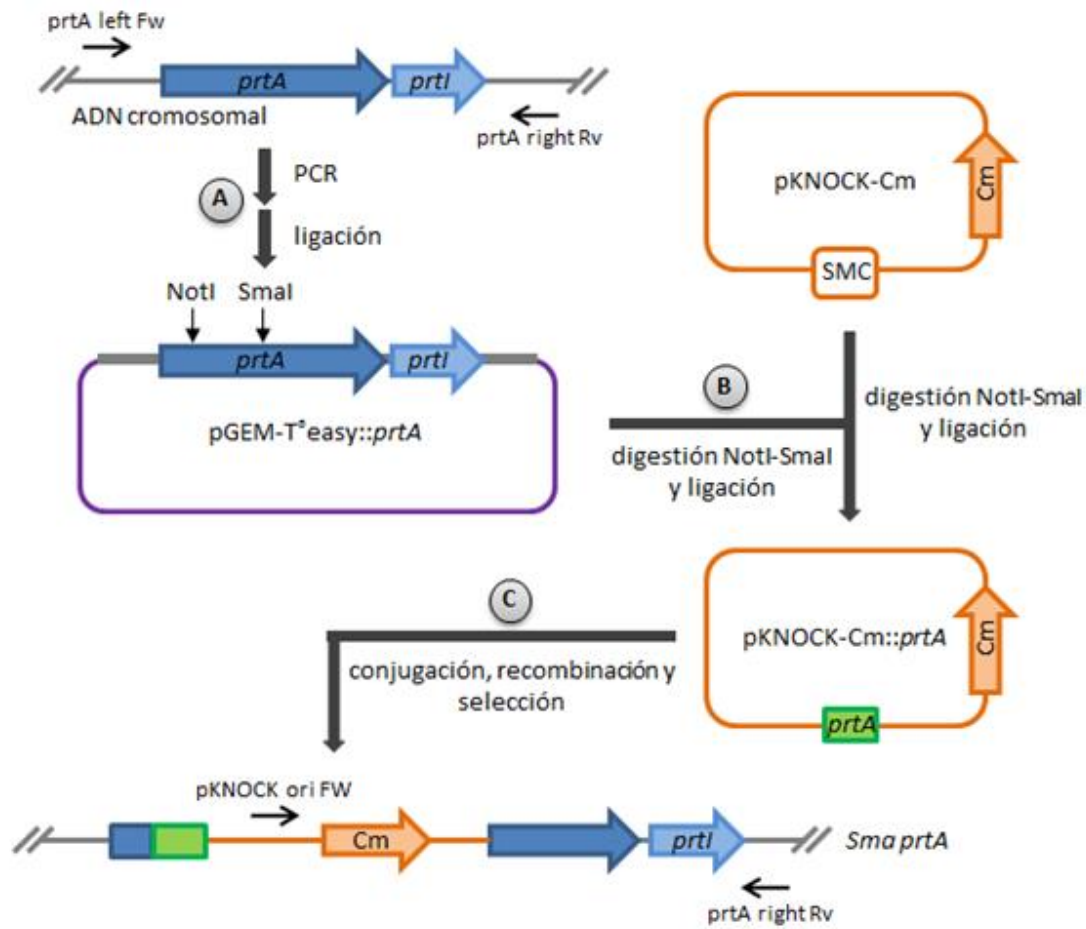


Figura III.2. Estrategia utilizada para construir la mutante *Sma prtA*. **A)** A partir del ADN cromosomal de *Sma* RM66262 se amplificó por PCR el gen *prtA* y sus regiones adyacentes, y se clonó en el vector pGEM-T®easy. **B)** Posteriormente, se digirió dicho vector utilizando las enzimas NotI y SmaI, generando un fragmento interno de *prtA* que se clonó en el vector pKNOCK-Cm. **C)** El gen *prtA* cromosomal fue interrumpido por recombinación, que genera la inserción del vector pKNOCK-Cm en *prtA*, la cual fue verificada por reacciones de PCR. SMC: sitio de múltiple clonado.

La construcción de las cepas *rssB*, *fur* y *slpE* se prosiguió de manera análoga a lo descrito previamente para la cepa *prtA*: se electroporó la cepa *E. coli* SM10 λ pir con la mezcla de ligación conteniendo el vector pKNOCK-Cm recombinante correspondiente, y mediante conjugación bipartita en *Sma* RM66262, dicho plásmido interrumpió el gen correspondiente por inserción del vector completo. La cepa mutante fue seleccionada a partir de colonias resistentes a cloranfenicol y la inserción cromosomal fue confirmada por PCR utilizando como molde ADN cromosomal purificado. Para dicha verificación, se utilizaron los pares de cebadores: pKNOCK ori Fw y *rssB* Rv, para la cepa *rssB*; *slpE* RT-Fw y pKNOCK ori Rv, para la cepa *slpE*; pKNOCK ori Fw y *fur* ORF Rv, para la cepa *fur*.

III.8.2. Construcción de cepas etiquetadas en *prtA* por inserción del vector suicida pKNOCK en *Sma* RM66626

La construcción de las cepas *Sma prtA*-3xFLAG y *Sma prtA*-6xHis se realizó de modo similar a lo expuesto en la sección III.8.1, a través de la estrategia de mutagénesis insercional dirigida utilizando el vector suicida pKNOCK-Cm (285).

Para el caso de la cepa *prtA*-3xFLAG, utilizando los cebadores *prtA* C-ter Fw y *prtA* C-ter Rv 3xFLAG, se amplificaron por PCR 495 pb correspondientes al extremo 3' de *prtA* de *Sma* RM66262 (exceptuando el codón de parada del gen). Adicionalmente, el oligonucleótido *prtA* C-ter Rv 3xFLAG codifica para el motivo aminoacídico 3xFLAG en su extremo 5'. Se obtuvo así un producto de 584 pb, el cual se separó electroforéticamente y se purificó de gel de agarosa, según se indica en las secciones III.3.9 y III.3.10. Posteriormente, el ADN purificado fue digerido con las enzimas XbaI y XhoI en sitios presentes en los extremos de dicho fragmento, purificado nuevamente y ligado en los mismos sitios del vector pKNOCK-Cm (figura III.3; A y B). Finalmente, se electroporó la cepa *E. coli* SM10 λ pir con la ligación pKNOCK-Cm::*prtA*-3xFLAG, y luego, mediante conjugación bipartita en *Sma*, dicho plásmido recombinó en el cromosoma de la bacteria dando lugar a una copia del gen *prtA* conteniendo la secuencia codificante del 3xFLAG en su extremo 3' (figura III.3.C). La cepa *prtA*-3xFLAG fue seleccionada a partir de colonias cloranfenicol resistentes y la inserción cromosomal del vector pKNOCK-Cm fue verificada por PCR, empleando los oligonucleótidos pKNOCK ori FW y *prtA* right RV.

Para la construcción de la cepa *prtA*-6xHis, se ejecutó una estrategia similar a la descrita arriba. En este caso, se amplificó por PCR el extremo 3' de *prtA* utilizando el par de oligonucleótidos *prtA* C-ter Fw y *prtA* C-ter Rv 6xHis, generando un producto de PCR de 536 pb, que fue purificado, digerido XhoI-XbaI, y clonado en el vector pKNOCK-Cm. El vector recombinante resultante, pKNOCK-Cm::*prtA*-6xHis se movilizó a la cepa salvaje de *Sma* mediante conjugación bipartita, y finalmente, la cepa *prtA*-6xHis fue verificada por PCR, empleando los oligonucleótidos pKNOCK ori FW y *prtA* right RV.

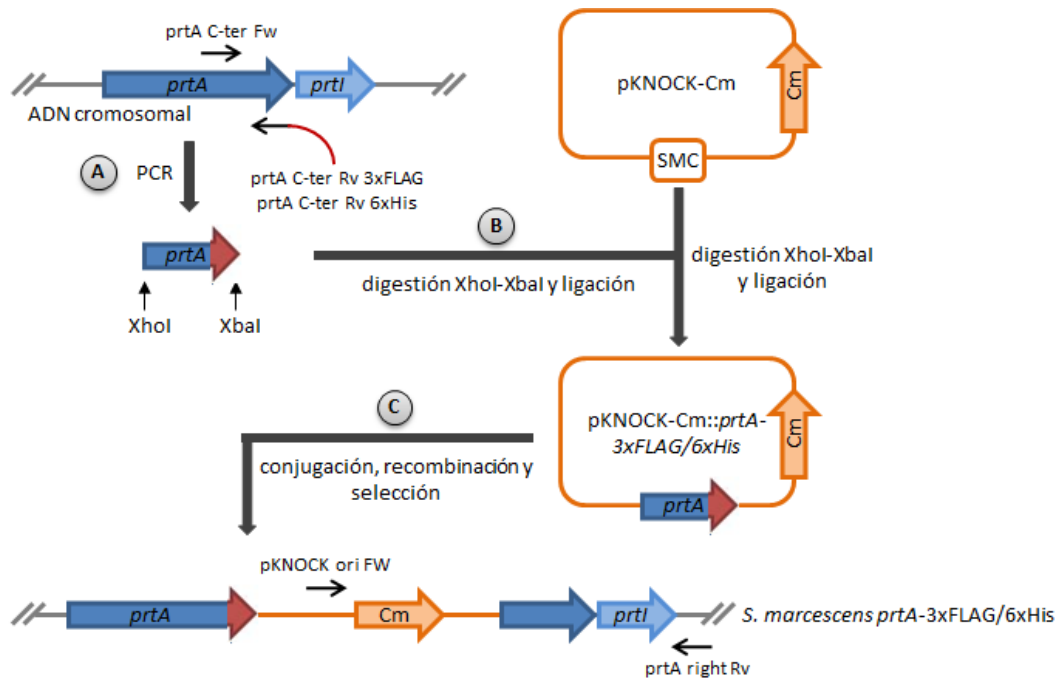


Figura III.3. Estrategia utilizada para construir las cepas *S. marcescens* *prtA*-3xFLAG y *prtA*-6xHis.

A) A partir del ADN cromosomal de *Sma* se amplificó por PCR el extremo 3' del gen *prtA*, adicionando en fase la secuencia codificante para la etiqueta 3xFLAG o 6xHis. **B)** Posteriormente, se digirió dicho ADN utilizando las enzimas XbaI-XhoI, y se clonó en el vector pKNOCK-Cm, previamente digerido con las mismas enzimas. **C)** El extremo 3' del gen *prtA* nativo fue reemplazado mediante recombinación homóloga por el fragmento recombinante clonado en el pKNOCK-Cm correspondiente, generando de este modo las dos versiones etiquetadas de PrtA en su extremo C-terminal. La inserción plasmídica fue verificada por reacciones de PCR. SMC: sitio de múltiple clonado.

III.8.3. Construcción de las cepas *ompA* y *ompA*::4-Cys en *Sma* RM66262 mediante la utilización del vector suicida pKNG101

La construcción de la cepa mutante *ompA* y de la cepa etiquetada *ompA*::4-Cys se realizó utilizando el vector suicida pKNG101 (286). Este vector posee un marcador de selección (*strAB*, de resistencia a estreptomicina) y un marcador de contraselección (*sacB*, codificante para la levanosacarasa que –en presencia de sacarosa– sintetiza polifrutosa, un producto tóxico para muchos géneros bacterianos Gram negativos). En primera instancia, se clonó un fragmento de ADN obtenido mediante SOE-PCR que contuvo la secuencia codificante de la etiqueta CCPGCC flanqueada por regiones de homología a *ompA* (detallado en la sección III.3.7) en los sitios XbaI y SpeI del sitio de múltiple clonado del pKNG101, y se transformó la cepa de *E. coli* SM10 λ pir. En segundo lugar, se movilizó dicho vector recombinante a la cepa *Sma* RM66262 a través de un protocolo de conjugación tripartita, produciéndose un primer evento de recombinación (figura III.4.A) que interrumpió la secuencia codificante de *ompA* dando lugar a la cepa *Sma ompA*, resistente a estreptomicina y sensible al crecimiento en sacarosa. La inserción del vector fue verificada a través de reacciones de PCR

utilizando los cebadores *ompA* left Fw loop3 y *strAB* Rv check 1. Posteriormente, se cultivó la cepa *ompA* durante 16 horas a 37°C con agitación en medio mínimo M9 suplementado con sacarosa 15% (p/v) como única fuente de carbono, a modo de forzar un segundo evento de recombinación (figura III.4.B). Este evento puede producirse en el locus α , dando un intercambio alélico indeseable dado que se obtiene un genotipo salvaje; o bien en el locus β , produciendo el intercambio alélico deseado con la inserción cromosomal en fase de la secuencia correspondiente a la etiqueta en el gen *ompA* (figura III.4.C). Las bacterias se sembraron en placas de LB-agar suplementadas con sacarosa 15% (p/v) y, posteriormente, se seleccionaron aquellas colonias sensibles a estreptomicina y resistentes a sacarosa. Finalmente, a través de reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *ompA* left Fw loop3 y FLASH check Rv se seleccionó la cepa recombinante en el sitio β .

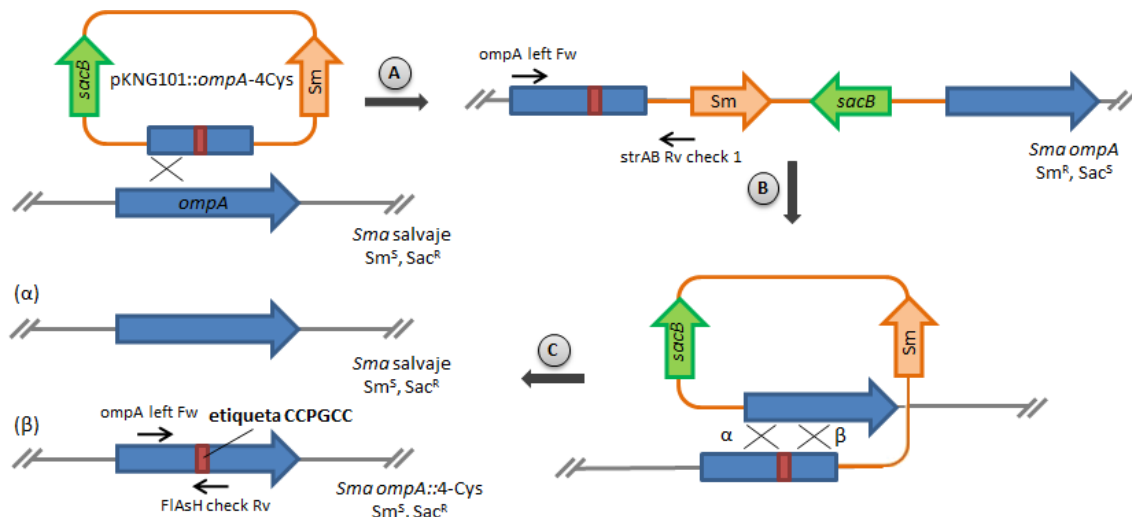


Figura III.4. Estrategia utilizada para construir las cepas *Sma ompA* y *ompA::4-Cys*. A) El plásmido suicida *pKNG101::ompA-4Cys* fue introducido por conjugación tripartita en *Sma* salvaje, dando lugar al primer evento de recombinación que provoca la disrupción del gen *ompA*. B) Posteriormente, durante el crecimiento en medio mínimo con sacarosa como única fuente de carbono, se produjo un segundo evento de recombinación, el cual provocó la escisión del plásmido y la reconstrucción del marco abierto de lectura para *ompA*. C) Un segundo evento de recombinación en el locus α generó un genotipo salvaje (indesable); mientras que la recombinación en el locus β dio lugar a la cepa etiquetada, la cual es verificada por PCR.

III.8.4. Construcción de la cepa mutante *prtA* en *Sma* DB10 por inserción del vector suicida *pKNG101*

La cepa mutante *prtA* de *Sma* *Db10* se originó a partir de un simple evento de recombinación en la cual el vector *pKNG101* interrumpió la secuencia codificante de *prtA*. Dicho evento ocurrió en el marco de una estrategia de mutagénesis sitio dirigida cuyo objetivo final fue el etiquetado de *prtA* con el epítipo *Strep*-tag dentro de su

secuencia codificante (específicamente en un sitio que denominamos *loop 1*). El primer paso consistió en la amplificación por PCR dos fragmentos flanqueantes a este sitio: el primero, de 365 pb, utilizando el par de cebadores *prtA loop 1 left Fw-Rv*; el segundo, de 434 pb, utilizando el par de cebadores *prtA loop 1 right Fw-Rv*. Ambos fragmentos fueron purificados, cuantificados, y 150 ng de cada uno de ellos sirvieron de molde para una reacción de SOE-PCR, efectuada de manera análoga a la descrita en la sección III.3.7. Se obtuvo un producto de empalme de 769 pb consistente en la secuencia codificante del *Strep-tag* (WSHPQFEK) flanqueada por regiones homólogas a *prtA*. Posteriormente, este producto fue purificado a partir de un gel de agarosa, clonado en el vector pJET 1.2/blunt e introducido en la cepa de *E. coli* One Shot® TOP10. Luego, a partir de una preparación plasmídica del vector pJET 1.2::*prtA-Strep-tag*, se realizó una doble restricción con las enzimas XbaI y BamHI liberando el fragmento de ADN previamente clonado, el cual se purificó a través de un gel de agarosa y se ligó al vector pKNG101 digerido con las enzimas XbaI y BamHI, generando el plásmido suicida pKNG101::*prtA-Strep-tag*. Esta construcción se introdujo en una cepa de *E. coli* SM10 λ pir, y mediante conjugación tripartita en *Sma* Db10, dicho plásmido recombinó en el cromosoma de la bacteria interrumpiendo el gen *prtA* por inserción del vector completo. Dicho evento se verificó por PCR a partir de ADN genómico de la cepa mutante, utilizando los cebadores *prtA loop1 left Fw* y *strAB Rv check 1*. Posteriormente, se intentó –sin éxito– seleccionar un segundo evento de recombinación que originara la versión etiquetada de PrtA en el sitio *loop 1*.

III.9. Análisis de actividad proteolítica secretada

III.9.1. Análisis cualitativo o semi-cuantitativo en medio sólido

La actividad proteolítica secretada durante el crecimiento de cepas de *Sma* en medio sólido se ensayó en placas de LB-agar suplementadas con leche en polvo descremada (La Serenisima) 2% (p/v). Las bacterias se inocularon a partir de un cultivo líquido saturado, o bien se repicaron a partir de colonias crecidas en otra placa. Posteriormente, las placas de LB-agar-leche fueron incubadas a la temperatura en estudio, durante 16, 24 o 48 hs (según se indique), y fotografiadas empleando el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad), en el modo de iluminación *Epi-white*. Mediante el software ImageJ para el análisis de las imágenes, se midieron los diámetros de los halos y de las colonias bacterianas. El cociente obtenido entre estos valores se utilizó como estimación semi-cuantitativa de la actividad proteolítica.

III.9.2. Análisis cuantitativo en medio líquido

Se cultivaron las cepas de *Sma* en el medio de crecimiento líquido correspondiente, en las condiciones indicadas para cada ensayo. Luego, se removieron las células bacterianas mediante dos series de centrifugación (la primera a 5000 X g, 5 min; la segunda a 15000 X g, 5 min), recuperando los sobrenadantes. La actividad proteasa extracelular se determinó utilizando el método de Wassif *et al.* levemente modificado (87). La mezcla de reacción consistió de 50 µl de azocaseína (Sigma) 1% (p/v), 50 µl de sobrenadante de cultivo y 140 µl de PBS, totalizando un volumen final de 240 µl. Se incubó dicha mezcla a 37°C durante 1 hora. La reacción se detuvo por agregado de 80 µl de TCA (Sigma) 10% (v/v), precipitando las proteínas no digeridas. Luego, la mezcla se centrifugó a 15000 X g durante 5 min y el sobrenadante, conteniendo azo-aminoácidos libres, fue recuperado. Se midió su absorbancia a 340 nm contra un control de reacción conteniendo LB en reemplazo de sobrenadante de cultivo. La actividad proteasa se calculó como: $(\text{Abs}_{340} \text{ muestra} - \text{Abs}_{340} \text{ blanco}) / (\text{DO}_{600} \text{ cultivo})$. La actividad proteasa relativa se calculó como: $\text{Actividad proteasa}_{\text{cepa o condición de estudio}} / \text{Actividad proteasa}_{\text{cepa o condición de referencia}}$.

III.10. Curvas de crecimiento bacteriano y de fluorescencia

Las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron en medio LB y se monitorearon en un lector de microplacas de 96 pocillos Synergy2 (BioTek), durante un período de 16 horas con control de temperatura. Cultivos bacterianos crecidos hasta saturación fueron diluidos 1/100 en medio LB. Un volumen de 100 µl de cada dilución se colocó en un pocillo de microplaca, y se incubó a 30° o 37°C –según se indica- en el lector de microplacas, y se determinó la DO₆₀₀ cada 60 min.

Para las cepas conteniendo el vector reportero pPROBE::P_{prtA}-gfp [ASV], se ensayaron curvas de fluorescencia: a partir de cultivos saturados crecidos en medio LB con kanamicina, se realizó una dilución 1/100 en el medio indicado y se sembraron 100 µl de cada dilución en un pocillo de microplaca, la cual se incubó a 30° o 37°C con agitación durante 16 horas en el equipo Biotek Synergy 2, periodo durante el cual se midió de forma simultánea la DO₆₀₀ y la fluorescencia emitida por la GFP (λ excitación = 485 ± 35 nm; λ emisión = 535 ± 25 nm) cada 60 min. Al valor de fluorescencia obtenido se le sustrajo la fluorescencia intrínseca de las bacterias, y luego fue normalizado respecto a la DO₆₀₀ del cultivo.

III.11. Técnicas bioquímicas y moleculares de proteínas

III.11.1. Preparación de extractos extracelulares de *Sma*

3 ml de cultivo de las cepas de *Sma*, crecidas en las condiciones indicadas, fueron centrifugados durante 10 min a 6000 X g. Los sobrenadantes fueron filtrados con filtros de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,2 μ m; Minisart, Sartorius Stedim Biotech) y precipitados con TCA 12% (v/v) durante 2 horas a 4°C. La mezcla fue centrifugada 20 min a 20000 X g y lavadas una vez con 1 ml de acetona (Merck) fría. Las proteínas precipitadas fueron resuspendidas en 60 μ l de solución de siembra de proteínas (Tris-HCl 120 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 0,5 % (v/v); glicerol 2% (v/v); SDS 2% (p/v); y azul de bromofenol 0,002% (p/v).

III.11.2. Preparación de extractos totales de *Sma*

3 ml de cultivo de las cepas de *Sma*, crecidas en las condiciones indicadas, fueron centrifugados durante 10 min a 6000 X g. El sedimento celular fue resuspendido en un volumen (en ml) igual a la $DO_{600}/10$ en solución de siembra de proteínas (Tris-HCl 120 mM pH 6,8; β -mercaptoetanol 0,5 % (v/v); glicerol 2% (v/v); SDS 2% (p/v); y azul de bromofenol 0,002% (p/v).

III.11.3. Preparación de membrana externa de *Sma*

Para obtener la fracción de membrana externa (ME) de *Sma*, se siguió el protocolo descrito por McMahon *et al.* (123). Células bacterianas cultivadas en la condición indicada se separaron de los sobrenadantes por centrifugación (6000 X g; 10 min). Se resuspendió el pellet en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; $MgCl_2$ 50 mM. Luego, las células fueron lisadas mediante 5 pulsos de sonicación de 30 segundos cada uno al 40% de la amplitud máxima espaciados 4 min entre sí, empleando un procesador ultrasónico GEX 600 (Sonics & Materials, Inc). El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. La fracción correspondiente a membranas totales fue recolectada por ultracentrifugación de la suspensión celular a 100.000 X g durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, las membranas externas fueron obtenidas por extracción diferencial con el buffer de sonicación suplementado con Tritón X-100 1,5% (v/v) e incubación durante 16 horas a 4°C, con agitación suave. El Tritón X-100 solubiliza las membranas internas. Las membranas externas forman micelas y son finalmente recolectadas por centrifugación a 100.000 X g durante 1 hora a 4°C.

III.11.4. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinconínico utilizando un kit comercial (Sigma), según especificación del fabricante. Brevemente, se agregaron 200 µl de reactivo, conteniendo CuSO₄ y solución de ácido bicinconínico en una proporción 1:50 en volumen, a 50 µl de muestra y se incubó a 37°C. A los 10 min, se midió absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas BioTek Elx808. Todas las determinaciones se efectuaron por duplicado y utilizando dos diluciones diferentes de la muestra. Como testigo se utilizó albúmina sérica bovina (Sigma).

III.11.5. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Los extractos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida. Antes de la siembra, las muestras se calentaron 5 min a 100°C en solución de muestra conteniendo: Tris-HCl 120 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 0,5% (v/v); glicerol 2% (v/v); SDS 2% (p/v); y azul de bromofenol 0,002% (p/v). Las corridas electroforéticas se realizaron en una solución tampón Tris base 25 mM; glicina 192 mM pH 8,3; y SDS 0,1 % (p/v), a una intensidad de corriente constante de 20 mA. La concentración de poliacrilamida utilizada en los geles de separación fue de 10, 12 o 15% (p/v), según se indique.

III.11.6. Tinción y visualización de geles con azul de Coomassie o nitrato de plata

Luego de la separación proteica por electroforesis indicada el apartado anterior, se incubaron los geles durante al menos 1 hora con agitación constante en una solución conteniendo: azul brillante de Coomassie R 250 (Sigma) 0,25% (p/v); isopropanol (Merck) 30% (v/v); ácido acético (Merck) 10% (v/v). La solución fue previamente filtrada a través de un papel de filtro Whatman N°1. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos de los geles con agua caliente, hasta lograr que el fondo fuera claro. Los geles teñidos fueron visualizados y digitalizados usando el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), utilizando el modo de iluminación *Trans-white*.

Alternativamente, los geles se tiñeron con una solución de nitrato de plata siguiendo el protocolo descrito por Chevallet M. *et al.* (288).

III.11.7. Transferencia e inmunodetección de proteínas en membrana de nitrocelulosa (*Western blot*)

Las muestras proteicas fueron sometidas a SDS-PAGE (sección III.11.5) y luego fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Life Sciences) en una cuba de transferencia semi seca Trans-blot SD (Bio-Rad). La transferencia se llevó a cabo en solución Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM y metanol 10% (v/v), durante 30 min con una intensidad de corriente constante de 300 mA. Una vez finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada durante 1 hora con solución TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,6; NaCl 137 mM) conteniendo 5% (p/v) de leche en polvo descremada. Posteriormente, se la incubó por 1 hora con el anticuerpo primario en una dilución adecuada en solución TBS y, al cabo de esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 min con TBS. Después, la membrana se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina (Sigma) o a peroxidasa de rabanito (Sigma) en una dilución 1/3500 en TBS. A continuación, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS. Para el revelado a través de la fosfatasa alcalina, se incubó la membrana con 3 ml de la solución Tris 100 mM pH 9,0; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM conteniendo BCIP 0,15 mg/ml y NBT 0,3 mg/ml disueltos en N,N-dimetilformamida 70% (v/v), hasta desarrollo de color. Los componentes NBT y BCIP reaccionan con la fosfatasa alcalina produciendo un precipitado insoluble color púrpura. En el caso de incubación con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanito, las membranas fueron reveladas mediante una reacción de quimioluminiscencia con ECL Plus (GE Life Sciences), según las indicaciones del fabricante. Las imágenes fueron tomadas mediante el sistema de captura de imágenes ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad), utilizando el modo *Chemi Hi-Sensitivity*.

III.12. Expresión y purificación de la proteína CpxR de fusión a cola de histidina

Las cepa *E. coli* M15/pREP4 pQE32::*cpxR*-6xHis fue cultivada en medio LB suplementado con ampicilina y kanamicina, con agitación constante a 37°C hasta saturación del cultivo. Luego se realizó una dilución 1/100 del cultivo en 300 ml de medio LB fresco. Se incubó a 30°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6, momento en que se adicionó ITPG (Sigma) a una concentración final de 50 μ M. Luego de 16 horas de crecimiento, las células fueron cosechadas por centrifugación a 6000 X *g* a 4°C durante 10 min. Posteriormente, se resuspendieron en 15 ml de solución de sonicación (Tris 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 20 mM; PMSF 1 mM) y se sometieron a 5

pulsos de sonicación de 30 segundos cada uno al 30% de la amplitud máxima espaciados 4 min entre sí, empleando un procesador ultrasónico GEX 600. El procedimiento se llevó a cabo a 4°C. La suspensión obtenida se centrifugó durante 20 min a 20000 X g. La fracción soluble fue filtrada a través de un filtro de acetato de celulosa (tamaño de poro 0,2 µm; Minisart, Sartorius Stedim Biotech) y se sembró en una columna de Ni-NTA (HisTrap™ 1 ml, Amersham Biosciences) previamente equilibrada con la solución de sonicación. Luego de la unión de la proteína, se realizó un lavado de la columna con solución de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 40 mM). Finalmente, se eluyó la proteína con solución de elución (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 0,5 M; imidazol 300 mM). Se seleccionaron las fracciones de interés mediante análisis en geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie y se procedió al desalado de las fracciones deseadas mediante una columna de Sephadex G50 (HiTrap™ Desalting, Amersham Pharmacia Biotech) previamente equilibrada con buffer de desalado (Tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 50 mM). La concentración de la proteína purificada se calculó en base a su absorbancia a 280 nm, utilizando la fórmula $Abs_{280} = c \cdot d \cdot \epsilon$, donde c es la concentración (mol/l), d es la longitud de la cubeta (cm), y ϵ es el coeficiente de extinción [l/(mol*cm)], con un valor igual a 15470 para CpxR.

III.13. Técnicas moleculares de interacción ADN/proteína

III.13.1. Fosforilación de oligonucleótidos

La reacción de fosforilación de los oligonucleótidos se llevó a cabo en un volumen de 15 µl, conteniendo solución de fosforilación comercial suplementada con 45 µCi de [γ -32P] ATP (3000 mCi/µmol; 10 µCi/µl; Perkin Elmer Inc.), 15 pmoles del oligonucleótido prom prtA Fw o prom prtA Rv, y 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega). Se incubó 30 min a 37°C, y luego se detuvo la reacción por inactivación de la enzima, calentando la mezcla a 65°C durante 10 min. Se separaron 3 µl del oligonucleótido marcado para las reacciones de secuenciación (sección III.13.4) y el resto se utilizó para amplificar mediante PCR el fragmento del promotor de *prtA*.

III.13.2. Ensayos de retardo electroforético del ADN

La interacción *in vitro* de la proteína CpxR-6xHis con la región promotora de *prtA* fue analizada mediante la técnica de retardo de la movilidad electroforética descrita por primera vez por Lane *et al.* (289).

El fragmento de ADN de 500 pb de la región promotora fue amplificado por PCR utilizando los pares de cebadores prom prtA FW y prom prtA Rv. Previamente se

fosforiló el extremo 5' del cebador prom *prtA* Rv con [γ - 32 P] ATP por medio de la oligonucleótido quinasa T4, como se detalla en la sección anterior. Aproximadamente 15 ng (45 fmoles) de la sonda marcada fueron incubados con 6 pmoles de CpxR-6xHis purificada, por 30 min a 30°C. Esta mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 20 μ l, conteniendo además buffer comercial React³ 1X (Invitrogen), glicerol 10% (v/v), ADN de esperma de salmón 2,5 μ g/ml, BSA 25 μ g/ml y acetilfosfato 20 mM, utilizado para fosforilar al regulador CpxR (durante 30 min a 30°C, previo al agregado de la sonda). La mezcla se sembró en geles de poliacrilamida-bisacrilamida de concentración final 5%-0,1% (p/v). Para los ensayos de competencia específica se utilizó ADN no radioactivo amplificado a partir de los cebadores prom *prtA* Fw y prom *prtA* Rv. En el caso de los ensayos de competencia inespecífica, se utilizó ADN no radioactivo amplificado a partir de los cebadores nucleasa FW y nucleasa Rv. Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo a una intensidad de corriente de 10 mA por gel. Los geles fueron secados a 80°C durante 60 min en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT), para luego ser incubados con una placa radiográfica de alta sensibilidad (Kodak) durante 24 horas y escaneados usando el equipo Typhoon FLA 7000 (GE Life Sciences) en el modo *Phosphorimager*.

III.13.3. Ensayo de protección de la ADNasa I (huella digital o *footprinting*)

La técnica de *DNA footprinting* con ADNasa I se basa en la protección que brindan las proteínas de unión al ADN contra la digestión por la ADNasa I (290). Esta enzima interacciona con el ADN doble hebra, principalmente a través de contactos con el surco menor, e introduce un corte en el esqueleto azúcar-fosfato de una de las hebras.

Se realizaron reacciones de unión de manera análoga a la detallada en el punto anterior, utilizando 35 pmoles de la proteína CpxR-6xHis previamente fosforilada y aproximadamente 45 fmoles de ADN marcado correspondiente a la región promotora de *prtA*. Luego de 30 min de incubación a 37°C, se adicionaron 69 μ l de H₂O destilada, 10 μ l de solución 10X de ADNasa I compuesta por: Tris-HCl 400 mM pH 8,0; MgSO₄ 100 mM; CaCl₂ 10 mM; ADNasa I (RQ1 DNase, Promega) 1 U. La mezcla de reacción se incubó a 25°C durante 90 segundos. La reacción se detuvo por el agregado de 90 μ l de solución de corte conteniendo EDTA 20 mM pH 8,0 y 200 μ l de fenol-cloroformo en una proporción 1:1 (v:v). Se centrifugó a 15000 X *g* durante 10 min, se separó la fase acuosa, y se precipitó con 1 volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de amonio 5M. Se incubó a -20°C durante 16 horas, se centrifugó a 15000 X *g* durante 15 min, se lavó con etanol 70% (v/v), y se secó a 37°C. El precipitado se

resuspendió en 7 μ l de solución de siembra desnaturalizante (NaOH 10 mM; formamida 95% (v/v); azul de bromofenol 0,05% (p/v); xilencianol 0,05% (p/v)) y se sembró en un gel de secuenciación como se describe en el punto siguiente.

III.13.4. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN se realizó utilizando el equipo comercial fmol (Promega). Éste utiliza una modificación del método enzimático (291), en el que la enzima Taq polimerasa sintetiza una hebra complementaria del ADN que se desea secuenciar a partir del oligonucleótido marcado. El método se basa en la capacidad de la ADN polimerasa de incorporar 2',3'-didesoxinucleósidos trifosfato, los cuales, al carecer de hidroxilo 3', impiden que continúe la síntesis. De modo que se realizan cuatro reacciones, cada una en presencia de los cuatro desoxinucleósidos trifosfato y de un didesoxinucleósido trifosfato. Al finalizar la reacción, cada tubo contiene una población de cadenas extendidas, todas con el mismo extremo 5' determinado por el cebador, y con extremos 3' variables, que terminan en un didesoxinucleósido específico. Se utilizaron como molde 0,05 pmoles del fragmento de ADN a secuenciar y 1,5 pmoles del oligonucleótido marcado con ^{32}P y se siguieron las instrucciones del fabricante del kit de secuenciación. Al finalizar, las reacciones se mezclaron con solución de siembra desnaturalizante de composición final: formamida 32% (v/v); NaOH 3 mM; azul de bromofenol 0,025% (p/v); xilencianol 0,025% (p/v).

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida de concentración 6% (p/v), en presencia de urea 6 M. Antes de la siembra, las muestras fueron calentadas a 70°C durante 2 min. Se utilizó TBE 1X como solución de electroforesis. La corrida electroforética se llevó a cabo a una potencia constante de 60 W durante 4,5 horas. Los geles se secaron a 80°C durante 60 min en un desecador de geles con bomba de vacío (SGD 2000 SAVANT). Finalmente se expuso el gel seco en un cartucho de exposición con pantalla intensificadora durante 16 horas y se escaneó utilizando un equipo Typhoon FLA 7000 (GE Life Sciences) en el modo *Phosphorimager*.

III.14. Vesículas de membrana externa (OMVs)

III.14.1. Aislamiento y purificación de OMVs

Como "protocolo estándar" de purificación de OMVs se siguió el procedimiento descrito por McMahon *et al.* (123). Brevemente, células correspondientes a 55 unidades de DO_{600} provenientes de un cultivo en fase estacionaria de *Sma* fueron removidas por centrifugación a 6000 X g. Los sobrenadantes fueron filtrados a través

de membranas de ésteres de celulosa (Sartorius) con tamaño de poro de 0,45 μm . Las OMVs se recuperaron mediante la ultracentrifugación de los filtrados de sobrenadante a 100.000 X g durante 3 horas a 4°C (en rotor Ti90; ultracentrífuga Optima L-90K, Beckman Coulter). El pellet vesicular fue resuspendido en 500 μl de PBS.

El “protocolo optimizado” de purificación de OMVs se desarrolló introduciendo modificaciones al procedimiento descrito previamente por Bauman *et al.* (292). A partir de un cultivo saturado de *Sma* salvaje o *prtA*, se realizó una dilución 1/500 del cultivo en 500 ml de medio LB fresco. Se incubó a 30°C en agitación constante durante 16 horas, alcanzando un DO_{600} de aproximadamente 3 unidades. Se separaron las células mediante dos centrifugaciones consecutivas (6000 X g ; 10 min; figura III.5.A). Se recuperó el sobrenadante de cultivo y se filtró utilizando membranas de ésteres de celulosa con tamaño de poro de 0,45 μm , para eliminar células remanentes. 20 μl del filtrado resultante se sembraron en una placa de LB-agar, la cual se incubó a 37°C toda la noche, con el objeto de verificar su esterilidad. Al resto del filtrado, se agregó lentamente sulfato de amonio (Sigma) hasta llegar a un porcentaje de saturación del 80% (p/v) (figura III.5.B). La precipitación se extendió durante 16 horas, a 4°C y en agitación suave y constante. Posteriormente, se centrifugó la muestra a 10000 X g durante 20 min. Se decantó el sobrenadante, y el pellet fue resuspendido en 10 ml de buffer HEPES 50 mM pH 7,5. Se inyectó la muestra dentro de una membrana de diálisis (Sigma) con un valor de corte molecular de 12,4 kDa, y se dializó contra 2000 ml de buffer HEPES 50 mM pH 7,5 durante 16 horas a 4°C, con agitación. A continuación, se procedió a concentrar la muestra mediante el uso de una unidad de filtración centrífuga Amicon® Ultra 15 ml (Millipore) con un valor de corte molecular de 10 kDa, hasta obtener un volumen final de aproximadamente 500 μl (figura III.5.C). La muestra obtenida en este punto se denominó “OMVs/SSPs”, y contiene tanto las OMVs como también proteínas secretadas solubles no asociadas a OMVs (SSPs; *soluble secreted proteins*).

Para continuar con la purificación, se aplicó una etapa de separación por gradiente de densidad, donde la menor densidad de las OMVs –dada por su contenido lipídico- provoca su separación de aquellos componentes no vesiculares que migran hacia las densidades mayores del gradiente. Se generó un gradiente de densidad continuo del 30% al 60% (p/v) de sacarosa, en un volumen final de 11 ml, al cual se inyectó el equivalente a 4 mg de proteína de la muestra OMVs/SSPs, previamente dosada por el método del ácido bicinonínico (sección III.11.4). Se centrifugó el gradiente de sacarosa conteniendo la muestra a 150.000 X g durante 16 horas a 4°C, utilizando un rotor SW40 Ti (Beckman Coulter) (figura III.5.D). Luego, se recolectaron

cuidadosamente fracciones de 1 ml desde la cima del tubo, las cuales fueron sometidas a análisis de perfil proteico, de inmunodetección de flagelina y porina, y de cuantificación de contenido lípido, según se describe más adelante en el apartado de Resultados y Discusión.

Para finalizar, las fracciones seleccionadas que se encontraban enriquecidas en contenido vesicular fueron mezcladas, dializadas durante 16 horas –a través de una membrana de diálisis con un valor de corte molecular de 12,4 kDa- contra buffer HEPES 50 mM pH 7,5, y finalmente, lavadas con este mismo buffer mediante ultracentrifugación a 100.000 X *g*, obteniendo la muestra de OMVs purificadas, cuyo volumen final fue de unos 500 µl (figura III.5.E).

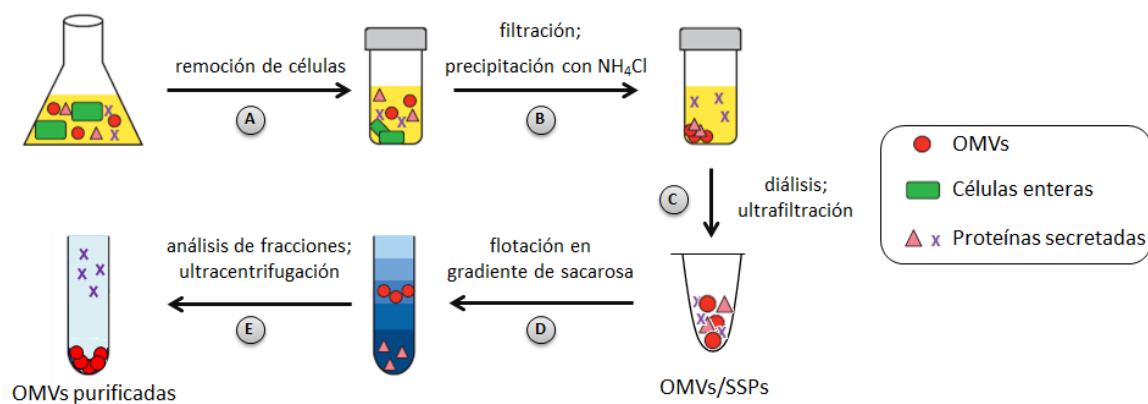


Figura III.5. Protocolo optimizado de purificación de vesículas de membrana externa (OMVs). Se utilizó un protocolo modificado de Bauman *et al.* que combina pasos de *salting out* del filtrado de sobrenadante, ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, y ultracentrifugación en ángulo fijo para obtener OMVs altamente purificadas.

III.14.2. Cuantificación de OMVs

La cuantificación de OMVs en los ensayos de co-incubación con células eucariotas y de microinyección en *Drosophila melanogaster* se realizó en base a la determinación del contenido proteico, detallada previamente en la sección III.11.4.

Alternativamente, se ensayó la cuantificación del contenido lipídico de las OMVs utilizando el fluoróforo lipofílico FM4-64 (Molecular Probes). Para analizar las fracciones generadas tras la ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, se diluyeron 5 µl de cada una en 195 µl de PBS. Posteriormente, se agregó el reactivo FM4-64 a una concentración final de 1,65 µg/ml, y se incubó a 37°C durante 10 min, en protección de la luz. Finalmente, se midió la fluorescencia utilizando los parámetros: λ excitación = 530 nm; λ emisión = 620 nm.

Para analizar la cantidad total de OMVs secretadas por una cepa particular en una determinada condición de crecimiento, se agregó FM4-64 a una concentración final de 1,65 µg/ml a 200 µl del sobrenadante de cultivo filtrado, y se siguió el mismo procedimiento que el descrito en el párrafo anterior.

III.14.3. Microscopía electrónica transmisión (TEM) de OMVs

El análisis por TEM de las OMVs se realizó a través del servicio provisto por el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Microscopía Electrónica LANAIS-MIE (UBA-CONICET). Brevemente, una suspensión de OMVs de concentración 0,15 µg/µl fue fijada durante 30 min a temperatura ambiente en una solución conteniendo: HEPES 10 mM pH 7,4; glutaraldehído 4% (v/v); NaCl 200 mM. Luego, las OMVs fueron teñidas con acetato de uranilo 2% (p/v) y visualizadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109T equipado con cámara digital Gatan ES1000W. La determinación del tamaño de las OMVs se realizó utilizando el software específico del microscopio electrónico.

III.15. Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tándem (LC-MS/MS)

El análisis por LC-MS/MS tanto de las OMVs como de la membrana externa fue realizado a través de la plataforma de proteómica del IBMC, de la Universidad de Estrasburgo, Francia. Las fracciones purificadas fueron sometidas a digestión por tripsina. La mezcla de péptidos generados fue fraccionada mediante un protocolo de HPLC a nanoescala, utilizando la tecnología Eksigent CHIP. A medida que los péptidos eluyeron, fueron sometidos a ionización por *electrospray* y luego introducidos en el espectrómetro de masa Triple TOF Sciex. Los péptidos fueron detectados, aislados, y fragmentados para producir espectros de masa en tándem de fragmentos iónicos específicos de cada péptido.

Los espectros resultantes se estudiaron con el programa Proteinscape (Bruker), y las proteínas fueron identificadas buscando en la base de datos UnitProt (www.uniprot.org) usando el motor de búsqueda Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html). El programa validó proteínas con una tasa de descubrimiento falso menor al 1%. Adicionalmente, se efectuó una validación manual, mediante la verificación de espectros de MS/MS para aquellas proteínas con un solo péptido.

III.16. Técnicas de tinción con FIAsh

III.16.1. Tinción de extractos proteicos totales

1 ml de cultivo de las cepas de *Sma*, crecidas en las condiciones indicadas, fueron centrifugados durante 5 min a 6000 X g. El sedimento celular fue resuspendido en un volumen (en ml) igual a la $DO_{600}/10$ en solución de siembra de proteínas conteniendo TCEP-HCl 50 mM (tris-(2-carboxietil)fosfina) (Sigma) como reductor en lugar de β -mercaptoetanol. Se calientan las muestras a 100°C durante 3 min y se las deja enfriar. En paralelo, se prepara una mezcla FIAsh-EDT 10X (FIAsh 1mM; EDT 10 mM) y se la incuba durante 15 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Posteriormente, se agrega esta mezcla a las muestras proteicas previamente preparadas, y se incuba durante 60 min más a temperatura ambiente en protección de la luz. Se realiza la electroforesis en condiciones desnaturalizantes (descrito en III.11.5) y se visualizan las proteínas etiquetadas a través de un transiluminador UV.

III.16.2. Tinción de suspensiones bacterianas

200 μ l de cultivo de las cepas de *Sma*, crecidas en las condiciones indicadas, fueron centrifugados durante 5 min a 6000 X g. El sedimento celular fue resuspendido en 200 μ l de LB. En paralelo, se prepara una mezcla FIAsh-TCEP-HCL 10X (FIAsh 1mM; TCEP-HCl 10 μ M) y se la incuba 15 min a temperatura ambiente protegida de la luz. Posteriormente, se incuba cada suspensión bacteriana con la mezcla FIAsh-TCEP-HCl durante 60 min a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se lavan las células dos veces con PBS. Finalmente, se colocan 3 μ l de las células marcadas sobre un pad de agarosa 1% (p/v) en HEPES 50 mM, y se observan al microscopio de fluorescencia. Las bacterias se visualizaron mediante el objetivo de inmersión en aceite 100x usando el filtro de excitación FITC-HYQ (λ = 460–500 nm).

III.16.3. Tinción de vesículas de membrana externa

Se prepararon OMVs a partir de las cepas indicadas, según el protocolo estándar descrito en la sección III.14.1. Luego, 4,8 μ l de una mezcla FIAsh-EDT, previamente incubada durante 15 min a temperatura ambiente, se agregaron a 15,2 μ l de la suspensión de OMVs (equivalentes a 3 μ g de proteína). La concentración final de la mezcla FIAsh-EDT fue 240 μ M y 1,2 mM, respectivamente. Las vesículas se marcaron durante 90 min a temperatura ambiente, con protección de la luz. Posteriormente, se utilizó un sistema de ultrafiltración (Microcon, Millipore) para lavar

el colorante no unido. Se realizaron dos lavados con una mezcla HEPES 50 mM – EDT 1,2 mM, y un tercer lavado sólo con HEPES 50 mM. Finalmente, se colocan 3 µl de las OMVs marcadas sobre un pad de agarosa 1% (p/v) en HEPES 50 mM, y se observan al microscopio de fluorescencia, como se indicó en la sección anterior.

III.17. Técnicas de cultivos celulares

III.17.1. Ensayos de co-incubación de células epiteliales con OMVs

Para la visualización de cambios morfológicos inducidos por OMVs en células epiteliales, se utilizaron células de la línea CHO (detalle en tabla III.2). 1×10^5 células fueron sembradas por pocillo en placas de 24 pocillos e incubadas toda la noche a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo utilizado fue α -MEM suplementado con SFB 10%. Posteriormente, se diluyó la suspensión de OMVs en medio α -MEM fresco a la dosis indicada, y se filtró con tamaño de poro 0,2 µm. Se aspiró el medio de cultivo de las células CHO, y se reemplazó con el medio de cultivo conteniendo la dosis indicada de OMVs. La co-incubación se extendió durante 20 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se visualizaron y fotografiaron utilizando un microscopio invertido (Nikon). Se aplicó un procedimiento similar utilizando células CHO-GFP-LC3 para determinar el gatillado de autofagia.

La citotoxicidad se cuantificó a través del ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), el cual se basa en la reducción mitocondrial del tetrazolio a formazán. La síntesis de formazán se considera proporcional al número de células viables. $1,3 \times 10^5$ células CHO en 200 µl de medio fueron inoculadas por pocillo en una microplaca de 96 pocillos, e incubadas durante toda una noche a 37°C atmósfera de CO₂ al 5%, antes de la adición de OMVs a la dosis indicada. La incubación se extendió durante 20 horas más. Transcurrido ese lapso, se agregó MTT (Sigma) a una concentración final de 0,05% (p/v) y se permitió reaccionar durante 3 horas a 37°C. A continuación, se removió el medio, y se solubilizaron las células y los cristales de formazán agregando 200 µl de DMSO. La cuantificación se realizó midiendo la absorbancia a 570 nm, y sustrayendo el fondo de absorbancia a 630 nm. La citotoxicidad relativa se calculó sustrayendo de un valor de 1 la fracción de actividad metabólica total detectada en una monocapa de células tratadas con OMVs en relación a una monocapa control tratada con HEPES 50 mM pH 7,5.

III.17.2. Ensayos de co-incubación de células epiteliales con OMVs marcadas fluorescentemente

30 µg de una preparación de OMVs salvajes correspondientes a cultivos bacterianos crecidos a 30°C hasta fase estacionaria se marcaron utilizando 5 µg de FM4-64 FX (Molecular Probes), durante 16 horas a 4°C. El fluoróforo no unido se lavó de la preparación mediante dos centrifugaciones consecutivas a 100.000 X g durante 90 min. Luego, se volvió a determinar la cantidad de proteína en las vesículas marcadas mediante el método del ácido bicinonínico, y se incubaron 5 µg de las OMVs con una monocapa de células CHO, previamente incubadas durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ a partir de un inóculo inicial de $7,5 \times 10^4$ células. Una vez transcurrido el periodo de co-incubación (120 min o 20 horas), se lavaron las células dos veces con buffer PBS, y se fijó la monocapa con paraformaldehído 3% (p/v). Finalmente, las células fueron montadas con el reactivo SlowFade Antifade en glicerol/PBS (Molecular Probes) y analizadas en el microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 (Nikon, Japón).

III.18. Técnicas de *Drosophila melanogaster*

III.18.1. Ensayos de microinyección de OMVs

Se utilizaron siempre moscas hembras adultas (de la línea indicada) de entre 3 y 7 días de vejez. Para la microinyección, se utilizó un dispositivo Nanoject II (Drummond Scientific Company). Las micropipetas de inyección se prepararon a partir de microcapilares de vidrio, tirando de estos hasta una resistencia de 80-100 MΩ en un equipo de estirado de electrodos. Una vez ensamblada la micropipeta de inyección en el dispositivo eyector, se la llenó con aceite sintético, para luego cargar entre 2-3 µl de la suspensión de OMVs correspondiente. Grupos de moscas pertenecientes a una misma réplica biológica fueron anestesiadas con CO₂, y posteriormente inyectados en la mesopleura (figura III.6) con 69 nl de la suspensión de OMVs. Inmediatamente, fueron transferidas a un vial conteniendo medio de crecimiento e incubadas a 25°C con 65% de humedad. La supervivencia se monitoreó cada una hora durante las primeras 5 horas, y luego se prosiguió hasta las 22 horas. Se descartaron aquellos individuos que sucumbieron en los primeros 20 min del tratamiento.



Figura III.6. Ejemplar hembra de *Drosophila melanogaster*, línea salvaje A5001, luego de la microinyección de 69 nL de OMVs. En este caso, previo al procedimiento, se adicionó una pequeña cantidad de colorante para comida a la muestras de OMVs, lo cual permitió verificar el ingreso de la solución de vesículas a la hemolinfa del insecto. La flecha negra señala la mesopleura, el área de tejido blando sobre el tórax por donde se introdujeron las micropipetas de inyección.

III.18.2. Ensayos de extracción de hemolinfa

Cohortes de 40 moscas hembras adultas de la línea indicada fueron microinyectadas con OMVs, según se indica en la sección anterior. Tres horas luego del tratamiento, los insectos sobrevivientes fueron anestesiados con CO₂. La hemolinfa se recolectó introduciendo una micropipeta de vidrio en la zona torácica del insecto (señalada en la figura III.6), donde la muestra exudó del insecto por capilaridad. Una cantidad de hemolinfa equivalente a 20 insectos se mezcló en 10 µL de un buffer de lisis consistente de: HEPES 30 mM; NaCl 150 mM; acetato de magnesio 2 mM; NP-40 (Sigma) 1% (v/v); y solución 2X de un coctel de inhibidores de proteasas (Promega).

III.18.3. Ensayos de silenciamiento génico

Para los experimentos de ARNi, hembras vírgenes Elav-Gal4 fueron cruzadas con machos expresando UAS-Kayak ARNi. Las cruces se realizaron a 25°C, y luego la progenie fue incubada durante una semana a 29°C con 70% de humedad.

III.19. Análisis bioinformáticos.

III.19.1. Predicción de la localización subcelular y función de las proteínas vesiculares.

La predicción de la localización subcelular de las proteínas identificadas por LC/MS-MS en las OMVs se realizó utilizando el programa pSORT (<https://psort.hgc.jp/>), ingresando los datos de secuencia aminoacídica proteica correspondientes a cada proteína.

La función predicha para cada proteína se asignó a en base a proteínas ortólogas en organismos relacionados, previamente clasificadas según las normas COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

III.19.2. Predicción del sitio de unión para CpxR en la región promotora de *prtA*.

El motivo consenso para el sitio de unión de CpxR fue generado entrenando el programa MEME (del inglés *Multiple Expectation Maximization for motif Elicitation*) (293) usando como datos los promotores de los siguientes genes regulados por CpxR en *Salmonella*: *degP*, *ppiA*, *yihE*, *dsbA*, *motAB*, *cheAW*, *ygjT*, *ppiD*, *cpxRA*, *cpxP*, y *csgBAC*. La matriz obtenida luego fue utilizada para buscar el motivo en la región promotora putativa de *prtA* de *Sma* RM66262 mediante el programa FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) (294).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I

“Vesículas de membrana externa en *Serratia marcescens*”

IV. Vesículas de membrana externa en *Serratia marcescens*

Introducción

Serratia marcescens es patógeno oportunista responsable de múltiples infecciones, frecuentemente identificado como agente etiológico de brotes nosocomiales. A pesar de que la incidencia de infecciones de *Sma* se ha visto incrementada en los últimos años, el análisis de los mecanismos y factores de virulencia involucrados en la colonización, invasión y diseminación –fundamento de la interacción bacteria-hospedador a largo plazo y necesario para la identificación de nuevos blancos terapéuticos- ha permanecido relegado.

Al igual que la mayoría de las bacterias Gram negativas –patógenas y no patógenas- *Sma* es capaz de secretar de modo natural vesículas proteolipídicas derivadas de la membrana externa. Como se refirió en la Introducción, estas vesículas de membrana externa (OMVs) están compuestas de lipopolisacárido, fosfolípidos, un subconjunto de proteínas de membrana externa, componentes periplásmicos, citoplásmicos, y extracelulares (166). Dentro del contexto de la interacción patógeno-hospedador, numerosos factores de virulencia de patógenos Gram negativos han sido encontrados asociados a las OMVs, y se postula que las vesículas actúan como un vehículo de diseminación de toxinas a larga distancia durante el proceso infectivo, pudiendo interactuar e internalizarse en las células hospedadoras e incluso también modular la respuesta inmune del hospedador (136, 168, 171, 295–297).

Trabajos previos realizados en colaboración con el grupo del Dr. Mario Feldman en la Universidad de Edmonton, Canadá, han indagado fundamentalmente en la biogénesis de OMVs en nuestro aislamiento clínico de estudio *Sma* RM66262. Se demostró que la formación de OMVs es un proceso termorregulado, con una producción al menos cinco veces mayor al cultivar las bacterias a 22 o 30°C con respecto a 37°C (123). Se observó, además, incremento en la vesiculización, tanto a 30°C como a 37°C, en una serie de cepas mutantes carentes de ECA (antígeno común de enterobacterias) (123), pudiendo especular que estos carbohidratos de superficie poseen un rol en la modulación de la producción de OMVs. Por otro lado, el análisis comparativo por espectrometría de masa entre preparaciones de membrana externa y vesículas de membrana externa arrojó evidencias claras sobre la existencia de un proceso de selección de carga de las OMVs en *Sma* RM66262, sugiriendo un posible rol patogénico de las vesículas al identificar una serie de factores de virulencia asociados a las mismas. Además, utilizando el modelo de infección de *Galleria melonella*, se demostró que la inyección de OMVs en el hemocelo de larvas

de dicho insecto tiene un efecto letal a las 24 horas, siendo la toxicidad de las OMVs independiente de la presencia de LPS en las preparaciones (123).

En base a estos antecedentes, en el presente capítulo se propuso como objetivo profundizar en la caracterización proteómica y estructural de la vesículas producidas por *Serratia marcescens*, para luego examinar su incumbencia en la interacción con el hospedador, mediante la utilización tanto de células eucariotas en cultivo como del insecto *Drosophila melanogaster*, identificando los componentes críticos de las OMVs para ejercer su rol patogénico.

IV.1. Puesta a punto de una metodología optimizada de purificación de OMVs

La recolección directa de OMVs a través de la ultracentrifugación de los filtrados de sobrenadante de cultivo bacteriano, detallada en la sección III.14.1 de Materiales y Métodos, es la metodología estándar de purificación de OMVs. Sin embargo, las muestras obtenidas de este modo raramente se encuentran puras, debido a que el procedimiento provoca la co-sedimentación de las OMVs junto con componentes no vesiculares, como ser agregados proteicos, pili y flagelos (292). Estos últimos se encuentran presentes en gran proporción en todas las bacterias flageladas. El análisis por LC-MS/MS de las OMVs preparadas a partir de nuestro aislamiento *Sma* RM66262 –realizado en colaboración con el laboratorio del Dr. Mario Feldman en Canadá– reveló la presencia de flagelina (123). Posteriormente, para contrastar dicho resultado preparamos OMVs de la cepa salvaje (*wt*) de *Sma*, y de su mutante isogénica aflagelada *flhD*, como control negativo. Se analizaron comparativamente los perfiles proteicos de ambas preparaciones y se ensayó la inmunodetección de flagelina por *Western blot*. Como vemos en la figura IV.1, los resultados corroboraron la presencia de flagelina en las OMVs preparadas a partir de la cepa *wt* cultivada en las condiciones indicadas.

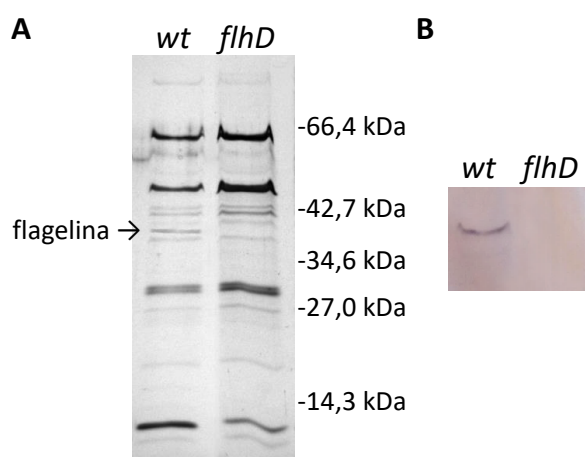


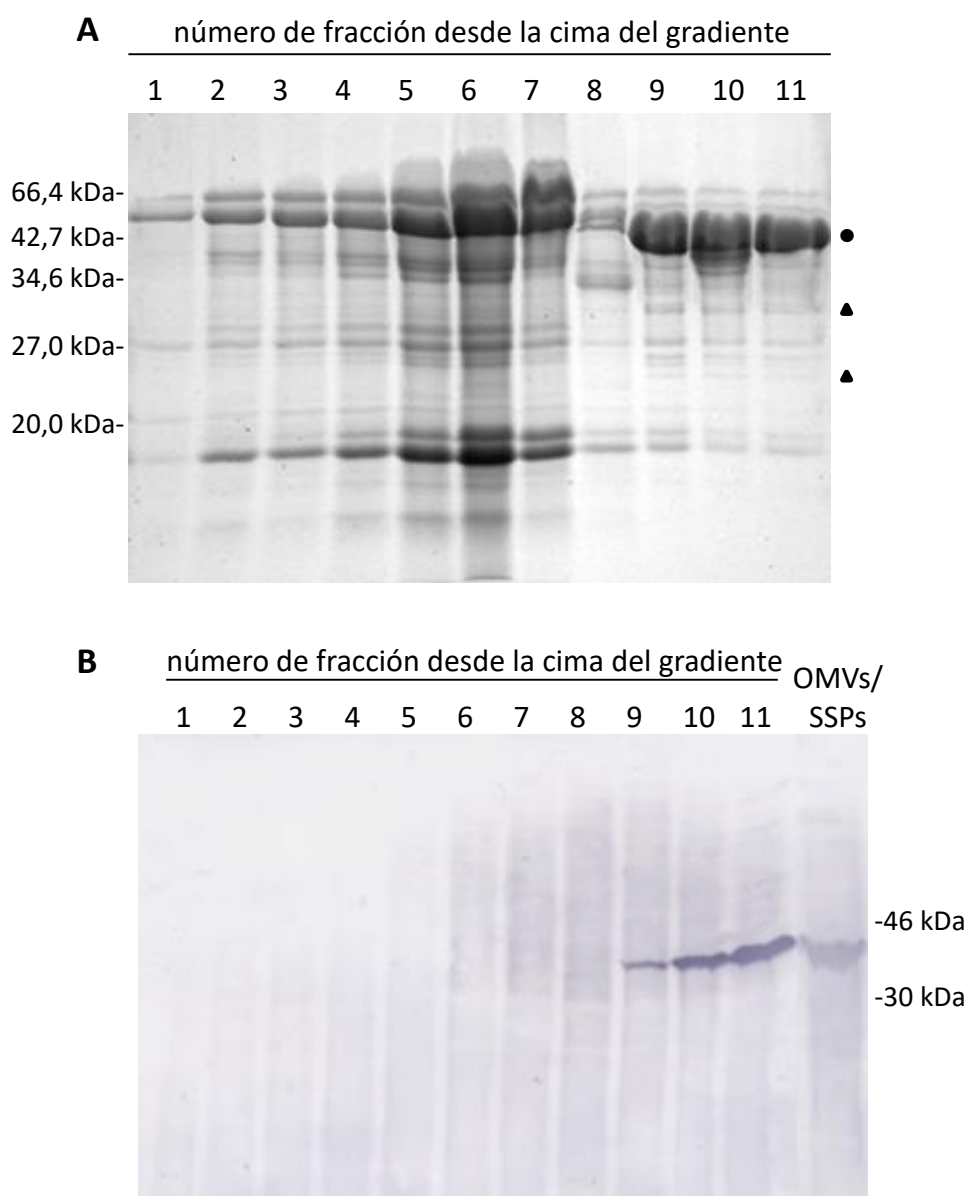
Figura IV.1. Contaminación de flagelina en preparaciones de OMVs. Se cultivaron las cepas salvaje (*wt*) y *flhD* de *Sma* durante 16 horas a 30°C en agitación. Posteriormente, se aislaron OMVs mediante un protocolo estándar, descrito en la sección III.14.1. **(A)** 5 µg de cada preparación se analizaron mediante SDS-PAGE, seguida de tinción de proteínas con plata, como se detalla en la sección III.11.5-6. **(B)** Inmunodetección de flagelina mediante *Western blot*. Se siguió el procedimiento descrito en la sección III.11.7.

La presencia de flagelina contaminante puede interferir con estudios sobre la reactividad de la célula hospedadora a las vesículas. Específicamente, la flagelina bacteriana es un potente inmunógeno capaz de activar el sistema inmune innato en mamíferos vía TLR5 y Naip5/6, generando una fuerte respuesta de células B y T (298). Asimismo, se han reportado efectos genotóxicos y citotóxicos dependientes de flagelo en diversas líneas de cultivo celular eucariota (299, 300). En *D. melanogaster*, si bien algunas evidencias sugieren que el insecto sería capaz de sensor este tipo de PAMP (Ferrandon D., comunicación personal), aún no se han logrado identificar la/las molécula/s receptora/s para flagelina.

Una segunda desventaja pertinente al protocolo estándar de preparación de OMVs surgió al analizar el bajo rendimiento de proteína total obtenido, calculado en alrededor de 1 µg por unidad de DO₆₀₀ del cultivo bacteriano. La baja cantidad de material recuperado hace necesaria la detección del patrón de proteínas a través de técnicas con alta sensibilidad, como la electroforesis en geles de acrilamida desnaturalizantes seguido de tinción con plata (288). Sin embargo, dicho método es laborioso, requiere mucho tiempo, y su uso es incompatible con un análisis posterior por espectrometría de masa. De este modo, el aislamiento de cantidades significativas de OMVs mediante esta metodología hace necesario el escalado en el volumen de los cultivos, y la utilización de un concentrador tangencial de flujo (no disponible en nuestro Instituto) que concentre los filtrados de sobrenadante a volúmenes suficientemente pequeños como para efectuar posteriores protocolos de ultracentrifugación. Ante los inconvenientes expuestos, consideramos prioritaria la puesta a punto un protocolo de purificación de OMVs alternativo capaz de salvar los problemas mencionados. Entonces, se ensayó un protocolo adaptado de Bauman *et al.* (292). Éste se basa en la concentración –por precipitación con sulfato de amonio– del sobrenadante de cultivo bacteriano, seguido de un paso de purificación en gradiente de densidad capaz de separar a las OMVs de componentes no vesiculares: el contenido lipídico de las vesículas hace que migren a densidades menores que los componentes no deseados. Este “protocolo optimizado” se describe con detalle en la sección de III.14.1 de Materiales y Métodos. A continuación, se muestra el análisis efectuado sobre las distintas fracciones obtenidas del gradiente de densidad, necesario para verificar las ventajas de esta metodología.

El material recuperado tras la precipitación por sulfato de amonio se denominó “OMVs/SSPs”, para el cual se obtuvo un rendimiento promedio de 8 µg proteína por unidad de DO₆₀₀ de cultivo. 4 mg de OMVs/SSPs se sembraron en un gradiente continuo de sacarosa 30-60% (p/v). Luego de una ultracentrifugación de 16 horas, se

recolectaron fracciones de 1 ml desde la cima del tubo. En primer lugar, como se muestra en la figura IV.2.A, se analizaron los perfiles proteicos obtenidos para cada una de las fracciones: se observó que la mayoría de las bandas proteicas presentan mayor intensidad a medida que se avanza hacia las fracciones intermedias del gradiente (5, 6 y 7). Desde la fracción 9 hasta la 11, se detecta una abundante banda proteica migrando alrededor de los 40 kDa (indicada con un círculo negro), de la cual especulamos que podría ser la flagelina. Asimismo, detectamos diferencialmente en este rango de fracciones otras dos bandas adicionales, de aproximadamente 30 y 25 kDa (señaladas con un triángulo negro). Posteriormente, mediante ensayos de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales anti-flagelina, se determinó que la flagelina migró entre las fracciones 9 y 11 (figura IV.2.B), en concordancia con lo observado previamente mediante tinción con azul de Commassie.



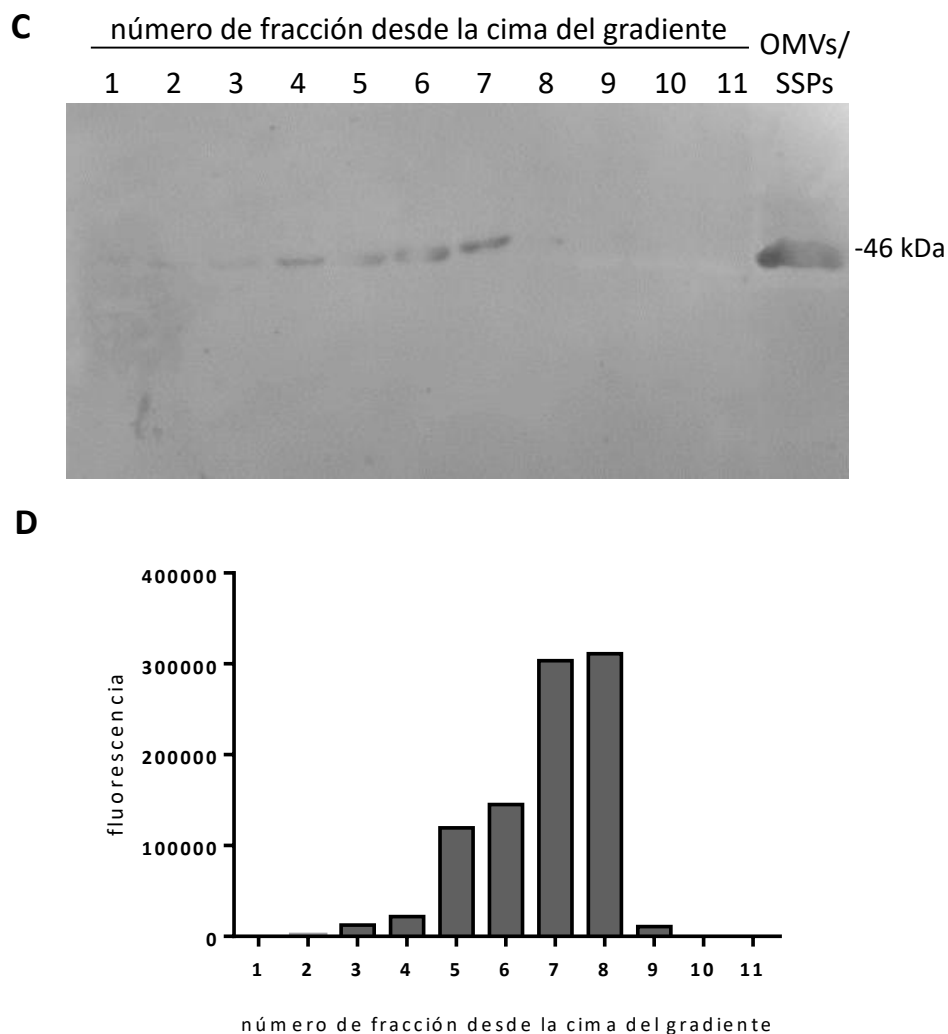


Figura IV.2. Protocolo optimizado de purificación de OMVs: análisis de las fracciones del gradiente de densidad. **A) Perfiles proteicos.** Visualización de las proteínas por tinción con Commassie. Se señalan aquellas proteínas que migraron diferencialmente a las densidades mayores. **B) Inmunodetección de flagelina.** Se utilizaron anticuerpos primarios policlonales anti-flagelina generados en conejo, y anticuerpos policlonales anti-conejo conjugados a fosfatasa alcalina. **C) Inmunodetección de la proteína de membrana externa OmpC.** Se utilizaron anticuerpos policlonales anti-OmpC (de *E. coli*) generados en conejo, y anticuerpos policlonales anti-conejo conjugados a HRP. En todos los casos, se sembraron 15 µl de cada fracción, la cual fue previamente concentrada 5 veces por precipitación con TCA, en un gel de poliacrilamida 12% (p/v). **D) Cuantificación del contenido lipídico.** Se diluyeron 5 µl de cada fracción con PBS en un volumen final de 200 µl, y se siguió el protocolo descrito en la sección III.14.2.

Luego, se identificaron aquellas fracciones enriquecidas en contenido vesicular utilizando dos estrategias complementarias. Por un lado, se ensayó la detección de la proteína OmpC a través de la técnica de *Western blot*. Resultados previos del análisis por espectrometría de masa mostraron que OmpC –normalmente localizada en la membrana externa bacteriana- es también parte del proteoma vesicular en *Sma* (123). El panel C de la figura IV.2 muestra que OmpC fue detectada con mayor intensidad en el rango de fracciones 4 a 7. En las fracciones 1-3 y 8, dicha señal se detectó

débilmente; mientras que en las fracciones más densas (9 a 11) la señal fue indetectable. Por otro lado, se realizó una estimación del contenido lipídico de cada fracción mediante la utilización de la sonda lipofílica FM4-64, reactivo que sólo es fluorescente al incorporarse a membranas. Previo a este ensayo, se corroboró que la fluorescencia emitida por el compuesto presenta respuesta lineal en función de las cantidad de OMVs; lo cual se verificó en el rango 0,5-50 µg de proteína (resultados no mostrados). A partir del análisis mostrado en la figura IV.2.D, pudimos establecer que solamente las fracciones intermedias del gradiente (5 a 8) presentaron valores significativos de fluorescencia con respecto al resto, indicando que el contenido vesicular migró en esas densidades. En conjunto, los análisis de expresión de OmpC y dosaje lipídico resultaron concordantes, con excepción de la fracción número 8, la cual a pesar de haber presentado una señal muy débil de OmpC, mostró altos niveles de fluorescencia. Una explicación tentativa a este fenómeno podría ser la existencia de una subpoblación de vesículas carentes selectivamente de ciertas proteínas de membrana externa, como OmpC.

En base a los análisis presentados, se seleccionaron las fracciones 5, 6 y 7 enriquecidas en OMVs. Para completar la purificación, dichas fracciones se mezclaron, se dializaron contra buffer HEPES 50 mM pH 7,5 y las OMVs fueron recolectadas y concentradas por un último paso de centrifugación, como se detalla en Materiales y Métodos, sección III.14.1. El perfil proteico de las OMVs purificadas de la cepa salvaje crecida a 30°C se muestra en la figura IV.3.

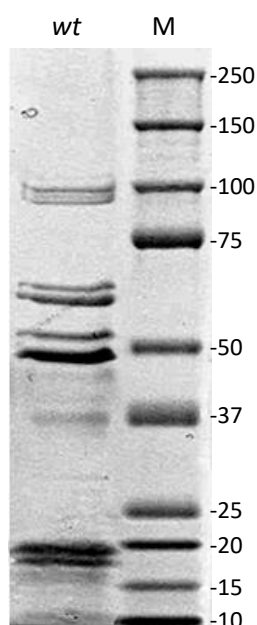


Figura IV.3. Perfil proteico de OMVs purificadas.

Se prepararon OMVs a partir de un cultivo de la cepa salvaje crecidos 16 horas a 30°C en agitación. 5 µg de la preparación se sembraron en un gel de poliacrilamida 4-15% (p/v). Una vez finalizada la corrida electroforética se procedió a la tinción con Coomassie. A la derecha (M) se muestran las bandas correspondientes al marcador de peso molecular expresado en kDa.

En resumen, consideramos que el protocolo desarrollado durante la primera parte de este Trabajo de Tesis fue ventajoso respecto del protocolo estándar, debido a que:

- permitió escalar el volumen del cultivo procesado, concentrando eficientemente el material por *salting out*, sin necesidad de utilizar un concentrador tangencial de flujo.
- se aplicó un paso de purificación por gradiente de densidad, que logró separar las fracciones enriquecidas en OMVs de algunos componentes no vesiculares indeseados, en especial, flagelina bacteriana.

IV.2. Análisis proteómico de OMVs

Con el objeto de estudiar las OMVs obtenidas mediante el protocolo descrito en la sección anterior, se abordó la caracterización proteómica de las vesículas. Las OMVs se recolectaron a partir de la cepa salvaje de *Sma* RM66262 cultivada a 30°C durante 16 horas, condición de crecimiento elegida ya que determinamos previamente que la vesiculización se encuentra favorecida a 30°C de temperatura de crecimiento respecto de 37°C (123). Tres muestras biológicas independientes fueron analizadas mediante nano LC-MS/MS, en la plataforma de proteómica del IBMC (Universidad de Estrasburgo, Francia) según se detalla en la sección III.15 de Materiales y Métodos. Un total de 56 proteínas fueron identificadas en los ensayos: 44 de ellas correspondieron a la primera muestra (Experimento 1); 29 correspondieron a la segunda (Experimento 2); y 30 proteínas se detectaron en la tercera réplica (Experimento 3). A partir del análisis comparativo, utilizando un diagrama de Venn, observamos que existe un subgrupo de 13 proteínas comunes a todos los experimentos; y otro subgrupo más amplio de 34 proteínas, que se detectaron en al menos dos de los tres experimentos (figura IV.4). Estos resultados nos indican que las proteínas que se ubicaron en la intersección triple corresponden con mayor certeza a la carga de las OMVs de *Sma* durante su crecimiento *in vitro*, en la condición ensayadas. No obstante, no descartamos del posterior análisis los componentes que se identificaron en 2 de las 3 muestras analizadas.

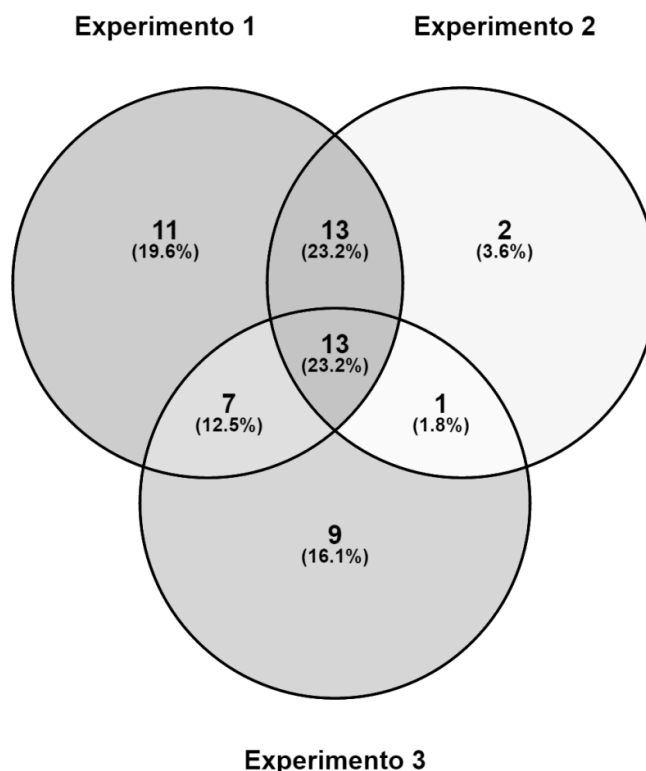


Figura IV.4. Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas coincidentes entre los experimentos, así como también el número de proteínas identificadas en cada ensayo. El análisis se efectuó a través del programa VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (301) .

La tabla IV.I muestra los resultados de los tres experimentos (Exp.1; Exp. 2; Exp. 3). Para cada una de las proteínas identificadas se señala: su identidad, dada por su número de acceso en la base de datos Unitprot (<http://www.uniprot.org/>) y su correspondiente anotación; su peso molecular (PM); el score obtenido en cada uno de los experimentos; y su localización subcelular canónica.

Nºacceso (Unitprot)	Anotación	PM	Exp.1	Exp.2	Exp.3	Localizacion subcelular canónica
V5ZWQ0_SERMA	Proteína de membrana externa A (OmpA)	39,7	532	62,3	454,4	Membrana externa
V5ZX34_SERMA	Lipoproteína (LppA)	8,3	363,4	315,1	137,6	Membrana externa
V5ZZE8_SERMA	Proteína de interacción con MltA (MipA)	28	158,9	65,9	135,3	Membrana externa
V6A0I5_SERMA	Proteína de membrana externa C (OmpC)	41,4	112,4	67,9	119,1	Membrana externa
V6A583_SERMA	Serralisina (PrtA)	52,2	1450	1675	600	Extracelular

V5ZXJ0_SERMA	Lipasa extracelular (LipA)	64,9	1300	1255	567,4	Extracelular
V5ZYC1_SERMA	Metaloproteasa (SlpD)	57,7	1103	1324	247	Extracelular
V5ZY52_SERMA	Glicosil hidrolasa	65,5	535,2	608,3	407,2	Periplasma
V6A0N7_SERMA	Catalase (KatA)	54,8	170,4	103,8	168,7	Periplasma
V5ZVR6_SERMA	Proteína de protección al DNA (Dps)	18,8	308,3	366,1	377	Citoplasma
V6A3S6_SERMA	Bacterioferritina (Bfr)	18,5	253,8	302,4	104,7	Citoplasma
V5ZYK6_SERMA	Glyceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GapA)	35,5	221	101,3	194,9	Citoplasma
V6A1D9_SERMA	Fructosa-bifosfato aldolasa (FbaB)	38,2	142,8	103,2	337,7	Citoplasma
V6A3M6_SERMA	Hemolisina (ShIA)	165	1852	1350	nd.	Membrana externa/extracelular
V5ZWF1_SERMA	Proteína de membrana externa F (OmpF)	41,1	295,2	161,6	nd.	Membrana externa
V5ZX54_SERMA	Proteína formadora de canal específico de nucleósido (Tsx)	33,4	165,8	39,7	nd.	Membrana externa
V5ZXJ3_SERMA	Proteína de la familia Rhs	157,9	108,6	113,2	nd.	Membrana interna
V5ZZS8_SERMA	Proteína Hcp-like	16,8	870,5	857,1	nd.	Extracelular
V5ZVW5_SERMA	Adhesina fimbrial	34,6	326,5	131,4	nd.	Extracelular
V6A2E8_SERMA	Fosfolipasa extracelular (PhIA)	32,7	82	80	nd.	Extracelular
V5ZVJ7_SERMA	Fimbrina (FimA)	17,7	81	57,5	nd.	Extracelular
V6A0X6_SERMA	N-acetilmuramil-L-alanina amidasa probable	28,4	322,5	218,7	nd.	Periplasma
V5ZX97_SERMA	Ferritina (FtnA)	19,4	123,4	92	nd.	Citoplasma
V5ZVJ6_SERMA	Enhancina	94,2	506,8	220,8	nd.	Desconocida

V6A116_SERMA	Proteína no caracterizada	17,1	118,4	82,1	nd.	Desconocida
V6A080_SERMA	Proteína no caracterizada	18,2	79	89,8	nd.	Desconocida
V5ZUA9_SERMA	Lipoproteína de membrana externa (NlpD)	35	149	nd.	249	Membrana externa
V6A3H3_SERMA	Proteína de ensamble de cápsula (Wzi)	52,6	180	nd.	63,3	Membrana externa
V5ZYE9_SERMA	Proteína de membrana externa W (OmpW)	23,3	48,4	nd.	127,6	Membrana externa
V6A3H1_SERMA	Probable lipoproteína de unión a fosfolípidos	19,9	213,4	nd.	163,7	Periplasma
V6A0J7_SERMA	Proteína probablemente exportada	18,5	66,6	nd.	97,3	Desconocida
V6A2H2_SERMA	Probable lipoproteína	8	285,6	nd.	364,2	Desconocida
V5ZWM3_SERMA	Probable lipoproteína	8	107,6	nd.	116,6	Desconocida
V6A5Y4_SERMA	Ácido delta-aminolevulinico dehidratasa (HemB)	37,7	nd.	42,6	108,2	Citoplasma
V5ZZC2_SERMA	Proteína del gancho flagelar (FlgE)	42,6	161	nd.	Nd.	Membrana externa
V5ZV19_SERMA	Lipoproteína de membrana externa asociada a peptidoglicano (Pal)	18,3	149,3	nd.	Nd.	Membrana externa
V6A2P4_SERMA	Transglicosilasa lítica de mureína unida a membrana (MltA)	41,4	85,9	nd.	Nd.	Membrana externa
V6A0L8_SERMA	Lipoproteína osmoticamente inducible (OsmE)	11,6	74,4	nd.	Nd.	Membrana externa
V5ZYK0_SERMA	Aldehído-alcohol deshidrogenasa (AdhE)	96,2	237,2	nd.	Nd.	Citoplasma
V6A2K9_SERMA	Lisina descarboxilasa (CadA)	81,1	226,5	nd.	Nd.	Citoplasma
V6A6D5_SERMA	Chaperonina (GroEL)	57,3	130,3	nd.	Nd.	Citoplasma
V6A6K3_SERMA	Probable aminopeptidasa (PepA)	54,7	85,9	nd.	Nd.	Citoplasma
V5ZXW8_SERMA	Piruvato quinasa (PykF)	50,5	82,4	nd.	Nd.	Citoplasma

V6A449_SERMA	Maltoporina (LamB)	48,2	73	nd.	Nd.	Periplasma
V5ZTJ5_SERMA	Proteína probablemente exportada	27,6	64	nd.	Nd.	Desconocida
V5ZW77_SERMA	Proteína de capa superficial (SlaA)	101,2	nd.	77,2	nd.	Membrana externa
V6A623_SERMA	Uridina fosforilasa (Udp)	27	nd.	42	nd.	Citoplasma
V6A0T7_SERMA	Lipoproteína predicha (VacJ)	28	nd.	Nd.	76	Membrana externa
V6A0Y6_SERMA	Probable proteína de membrana externa	43	nd.	Nd.	62,1	Membrana externa
V6A1G0_SERMA	Peptidasa B (PepB)	46,5	nd.	Nd.	298,5	Citoplasma
V5ZUC2_SERMA	Dihidrolipoil-transsuccinasa (SucB)	43,8	nd.	Nd.	96,9	Citoplasma
V5ZU05_SERMA	Histidina amonio liasa (HutH)	54,5	nd.	Nd.	91,7	Citoplasma
V6A3M1_SERMA	Glucosa-6-fosfato isomerasa (Pgi)	61,1	nd.	Nd.	85,1	Citoplasma
V6A4E3_SERMA	Subunidad ATP-dependiente de proteasa HslV	19	nd.	Nd.	76,2	Citoplasma
V6A117_SERMA	Enzima málica/fosfotransacetilasa (MaeB)	82,2	nd.	Nd.	63	Citoplasma
V6A5P1_SERMA	Superóxido dismutasa (SodA)	23,2	nd.	Nd.	57,8	Citoplasma

Tabla IV.I. Proteínas detectadas en las OMVs de *Sma* RM66262. Se cultivó *Sma wt* en medio LB a 30°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 3 unidades, y se siguió el protocolo descrito en la sección III.14.1 para purificar las OMVs. Tres réplicas biológicas (Exp.1; Exp. 2; Exp. 3) se analizaron mediante nano LC-MS/MS (sección III.15). Las proteínas se agruparon según la cantidad de veces que fueron detectadas en los experimentos, según su localización subcelular canónica, y luego, en orden decreciente de puntuación o *score* asignada por el programa Mascot.

La figura IV.5 muestra la distribución general de las localizaciones subcelulares canónicas predichas para el subgrupo de 34 proteínas detectadas en al menos dos experimentos de LC-MS/MS. La localización fue asignada teniendo en cuenta reportes previos en *Serratia*, estudios sobre proteínas homólogas en otros géneros bacterianos, y una predicción *in silico* realizada a través del software Psort, como se indica en la sección III.19.1. Aproximadamente un tercio del total (32%) correspondieron a proteínas de membrana externa. Las proteínas extracelulares representaron un 20%, seguido por un 18% de proteínas cuya localización subcelular no se pudo asignar.

Dentro de este grupo hay dos potenciales lipoproteínas, lo que sugeriría su asociación a membrana. Por último, las proteínas citoplasmáticas constituyeron un 18%, y las proteínas periplásmicas un 12%.

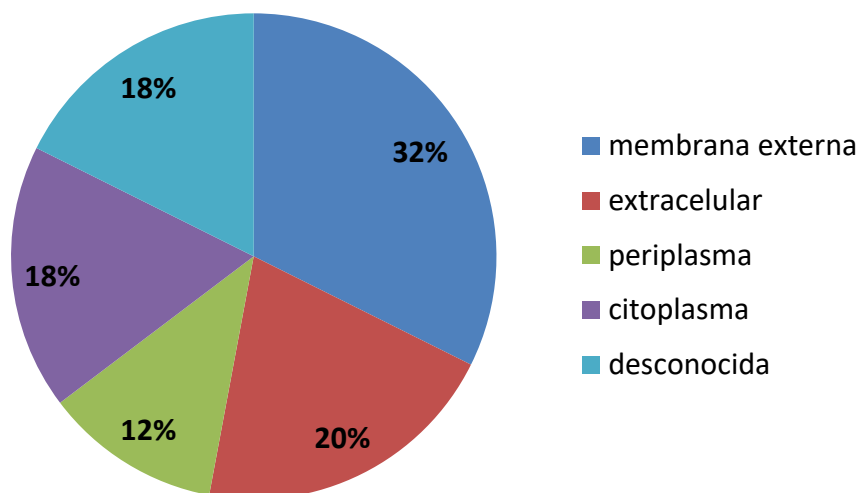


Figura IV.5. Distribución general de la localización subcelular predicha de las proteínas vesiculares. El análisis fue efectuado considerando el subgrupo de 34 proteínas detectadas en al menos dos de tres experimentos de LC-MS/MS.

La elevada proporción obtenida de proteínas de membrana externa y la ausencia de proteínas derivadas de la membrana interna bacteriana, corrobora el modelo en el que las OMVs son estructuras de simple membrana originadas a partir de evaginaciones de la capa externa de la envoltura bacteriana, que finalmente se desprenden, como se explicó en la Introducción. El valor de abundancia relativa de las proteínas de membrana externa respecto al proteoma vesicular es similar a los valores indicados en estudios de OMVs de otras especies Gram negativas, como *Escherichia coli* (302), *Vibrio cholerae* (303), y *Campylobacter jejuni* (304), donde representan entre el 30 y el 50% del total de proteínas detectadas.

En lo que respecta al grupo de proteínas de localización extracelular, se detectaron componentes pertenecientes a fimbrias tipo I, las cuales normalmente se anclan a la membrana externa bacteriana y actúan extendiéndose desde la misma (305), por lo que no es sorprendente su detección en OMVs. La hemolisina ShIA no es literalmente secretada al medio extracelular, ya que ejerce su acción unida a la membrana externa de la bacteria (91). En cuanto a la metaloproteasa SlpD, aún no se ha identificado su mecanismo de secreción (76). Por otra parte, se identificaron varias enzimas cuyos mecanismos de secreción han sido descritos previamente: la serralisina PrtA y la lipasa LipA son parte del secretoma LipBCD (57, 306), y la fosfolipasa PhlA requiere del flagelo para su secreción (102). Según el modelo

propuesto por Meta Kuehn (307), las proteínas con un transporte independiente de OMVs son capaces de asociarse a las vesículas mediante su afinidad de unión al LPS (localizado sobre la superficie de las mismas). Esta propiedad de asociación al LPS ha sido descrito para las gingipaínas y para las toxinas RTX (308, 309), familia dentro de la cual se encuentran PrtA y LipA. De acuerdo a la magnitud de la afinidad, la mayor parte de la población extracelular de la proteína se encontrará asociada a OMVs, como se ha reportado para la enterotoxina LT de *E. coli* ETEC (310); o bien existirán subpoblaciones asociadas a OMVs e independientes de OMVs, que coexistirán extracelularmente, como se ha demostrado para la α -hemolisina HlyA de *E. coli* (137).

La detección de proteínas periplásmicas es concordante con el modelo de biogénesis de OMVs, las cuales encapsulan material periplásmico antes de desprenderse de la envoltura bacteriana. Interesantemente, proteínas de gran abundancia en el periplasma de *E. coli* y conservadas en *Sma*, como LivJ y OppA (311), no fueron identificadas en las OMVs, apoyando la hipótesis de la existencia de mecanismos de selección diferencial de la carga vesicular (123).

En nuestro estudio, también encontramos un número significativo de proteínas citoplasmáticas. De acuerdo a algunos autores, las OMVs no deberían contener material citoplásmico (106); sin embargo, una gran cantidad de estudios de proteómica de vesículas en distintos organismos han reportado la detección de esta clase de proteínas (302, 312, 313). La manera en que componentes citoplásmicos podrían ingresar a las OMVs sin producir lisis celular permanece poco clara. En todo caso, deberían ser secretados en vesículas de doble membrana, externa e interna, como proponen algunos autores (314). En nuestro caso, varios de los componentes citoplasmáticos encontrados (GapA, FbaB, PykF, GroEL) han sido reportados previamente en otras especies como proteínas *moonlight*, es decir, proteínas capaces de cumplir con una segunda función, generalmente involucrada en virulencia, y por ende es factible detectarlas en localizaciones diferentes a la convencional (315). Por ejemplo, en *Streptococcus pyogenes*, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GapA) se encontró fuertemente adherida a la superficie bacteriana, y se demostró su capacidad de unirse a lisozima, proteínas del citoesqueleto, fibronectina y plasminógeno (316). Por su parte, la fructosa-bifosfato aldolasa (FbaB) ha sido descrita en *Streptococcus pneumoniae*, como una lectina de superficie celular capaz de unirse a un receptor de cadherina del hospedador (317). En *Neisseria meningitidis*, la misma aldolasa se reportó como una proteína de superficie celular involucrada en la adherencia a células en cultivo de mamífero (318). Extendiendo el análisis a algunas de las proteínas citoplásmicas detectadas en sólo una de las réplicas, se reportó a la

piruvato quinasa (PykF) en *Lactococcus lactis* como una proteína de superficie celular capaz de unirse a mano-proteínas fúngicas (319). Para el caso de la chaperonina GroEL, existe una serie de reportes que la describen como una proteína superficial cuya principal actividad *moonlight* sería la de modular la síntesis de citoquinas por fagocitos mononucleares (320, 321). Por otro lado, es importante destacar que no se detectaron componentes ribosomales en los experimentos de LC-MS/MS, a pesar de su alta abundancia dentro del citoplasma bacteriano. Este hecho descartaría la hipótesis de que la presencia de proteínas citoplasmáticas en OMVs podría ser consecuencia de la lisis celular durante el crecimiento; y por otra parte, sugiere que la inclusión de proteínas citoplasmáticas en las vesículas de membrana externa es selectiva, y no ocurre en función de su abundancia en el interior celular.

En la figura IV.6, se muestra la distribución de frecuencias de las funciones biológicas para el subgrupo de 34 proteínas detectadas en al menos dos experimentos. Los componentes prevalentes son aquellos involucrados en la biogénesis e integridad de la membrana externa. Lpp, Tol-Pal, OmpA y otras porinas son proteínas de membrana abundantes, y se encuentran en la mayoría de los proteomas de OMVs. Como se discutió en la Introducción, estas proteínas son importantes en el anclaje de la ME al PG, y por ende, estarían involucradas en los mecanismos que regulan la biogénesis de OMVs (117, 322). Por otro lado, MltA y MipA son hidrolasas del peptidoglicano y podrían estar involucradas en la acumulación de fragmentos del mismo en el espacio periplásmico, causando una presión de turgencia que promueva la liberación de OMVs (116, 117). MltA también ha sido descrita, junto a otras hidrolasas, como responsable de actividades interbacterianas, más precisamente de la destrucción de otras bacterias presentes en el mismo nicho, mediante degradación de sus paredes celulares (119). Los sistemas de transporte para carbohidratos, hierro (como la ferritina y bacterioferritina), y nucleótidos (Tsx) podrían contribuir al rol de las vesículas como “servicios públicos”, proveyendo el acceso a estos compuestos en una comunidad microbiana mixta (117).

En cuanto a la interacción con el hospedador, las proteínas con una predicción de función general según el sistema COG (metaloproteasas, hemolisina) representan en verdad factores de virulencia. Las metaloproteasas podrían estar involucradas en la degradación tanto de factores microbicidas (por ejemplo, anticuerpos y péptidos antimicrobianos) como de componentes estructurales de las células. Además de las toxinas específicas de *Sma*, proteínas como OmpA y OmpF poseen propiedades inmunomoduladoras y provocan la migración de leucocitos (323). Los componentes fimbriales asociados junto con ciertas proteínas de membrana externa como OmpA y

OmpW colaborarían en la unión de las OMVs con las superficies celulares blanco. Además OmpA de *E. coli* promueve la fagocitosis de LPS en macrófagos y contribuye a la invasión de células del endotelio microvascular de cerebro (324, 325).

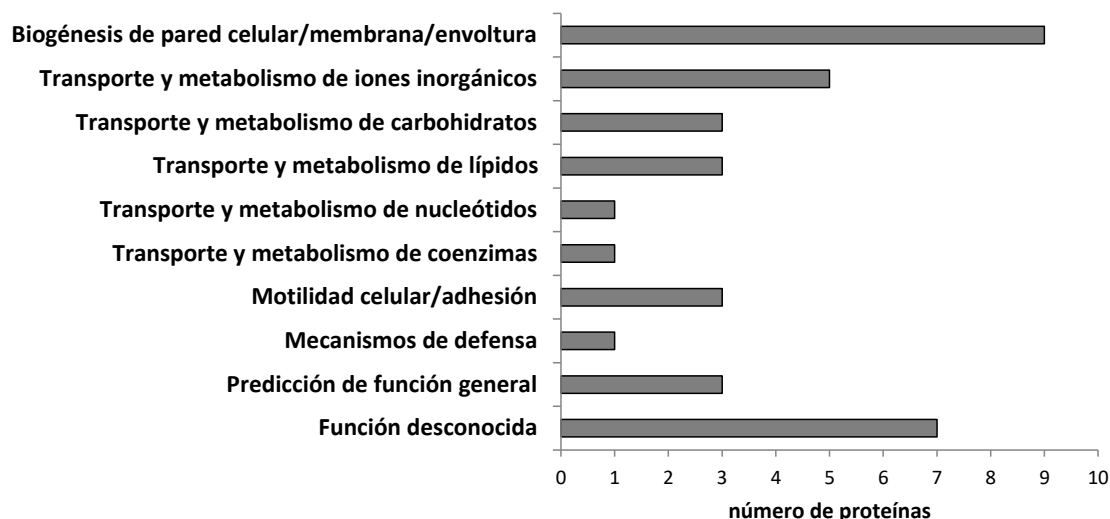


Figura IV.6. Asignación de funciones predichas para las proteínas vesiculares. La asignación de funciones se efectuó para el subgrupo de 34 proteínas identificadas en al menos dos experimentos de LC-MS/MS. Las funciones biológicas fueron categorizadas en concordancia con las normas de anotación COG (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

Con la finalidad de desarrollar un análisis comparativo entre las proteínas de la carga vesicular y aquellas de la membrana externa (ME), también se analizó por LC-MS/MS esta última fracción. La muestra de ME se obtuvo a partir del mismo cultivo bacteriano utilizado para purificar la segunda muestra de OMVs (Exp. 2), siguiendo el protocolo detallado en la sección III.11.3. El resultado arrojado por el análisis mediante espectrometría de masa fue un amplio grupo de 343 proteínas (tabla no mostrada), de las cuales sólo 18 coinciden con las detectadas en vesículas. Por consiguiente, sólo el 5,2% de las proteínas de membrana externa se empaquetaría en OMVs, lo que sugiere la existencia de mecanismos de selección de carga en OMVs, como se ha propuesto previamente para *Serratia* y *Porphyromonas* (123, 124). Proteínas típicamente abundantes en membrana externa y detectadas en nuestro ensayo (como TolC, LptD, BamA, MreBCD, etc) estarían siendo selectivamente excluidas de las OMVs durante su biogénesis. A partir de esta comparación, también se manifiesta la existencia de un subgrupo de 16 proteínas sólo detectadas en OMVs. Serían deseables análisis proteómicos adicionales que comparen la composición de la fracción de OMVs con la de sobrenadantes desprovistos de vesículas, con el fin de identificar aquellas proteínas cuya secreción dependa exclusivamente de su asociación a OMVs.

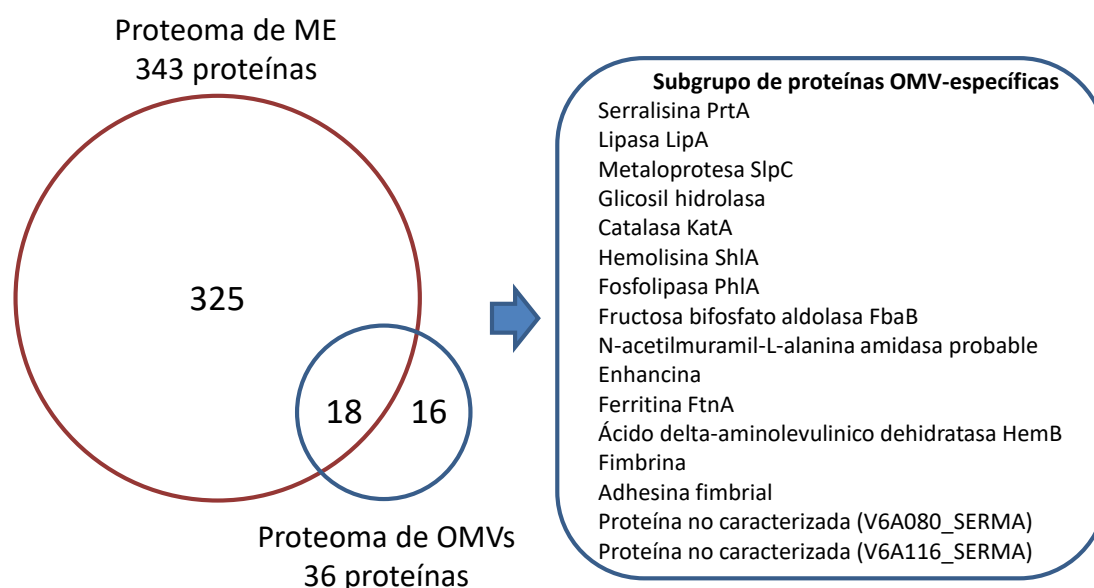


Figura IV.7. Diagrama de Venn mostrando el número de proteínas comunes y no comunes entre OMVs y ME. A la derecha, se detalla el subgrupo de proteínas presentes en vesículas pero ausentes en membrana externa. Para obtener la preparación de ME, se siguió el protocolo detallado en la sección III.11.3.

IV.3. Análisis por microscopía electrónica de transmisión de OMVs

Con el objeto de analizar la morfología, la integridad y el tamaño de las vesículas purificadas, se realizó un estudio de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de una suspensión de OMVs aislada a partir de la cepa salvaje cultivada en idénticas condiciones que las utilizadas para el análisis de LC-MS/MS de la sección anterior. El estudio se realizó a través del servicio provisto por el LANAIS-MIE (UBA-CONICET), y los detalles se encuentran en la sección III.14.3 de Materiales y Métodos. La inspección por TEM reveló que la mayor parte de la población de las OMVs son esféricas, cerradas, y de simple membrana (figura IV.8). No se detectaron cantidades significativas de fragmentos sueltos de membrana o vesículas lisadas, ni restos flagelares. Por otra parte, se observaron estructuras filamentosas que –de acuerdo a los datos obtenidos por LC-MS/MS- podrían ser fimbrias. La asociación de fimbrias con OMVs ha sido descripta en numerosos reportes, y –como se refirió previamente- contribuirían a las propiedades adhesivas y los potenciales roles patogénicos de las vesículas (171, 326). Posteriormente, se cuantificaron los diámetros vesiculares a partir de OMVs fotografiadas en tres campos distintos. Se obtuvo un rango de diámetros de 19-44 nm, con una media de 30,5 nm. Dichos parámetros correlacionan con estudios similares de OMVs en otros géneros bacterianos (307, 327).

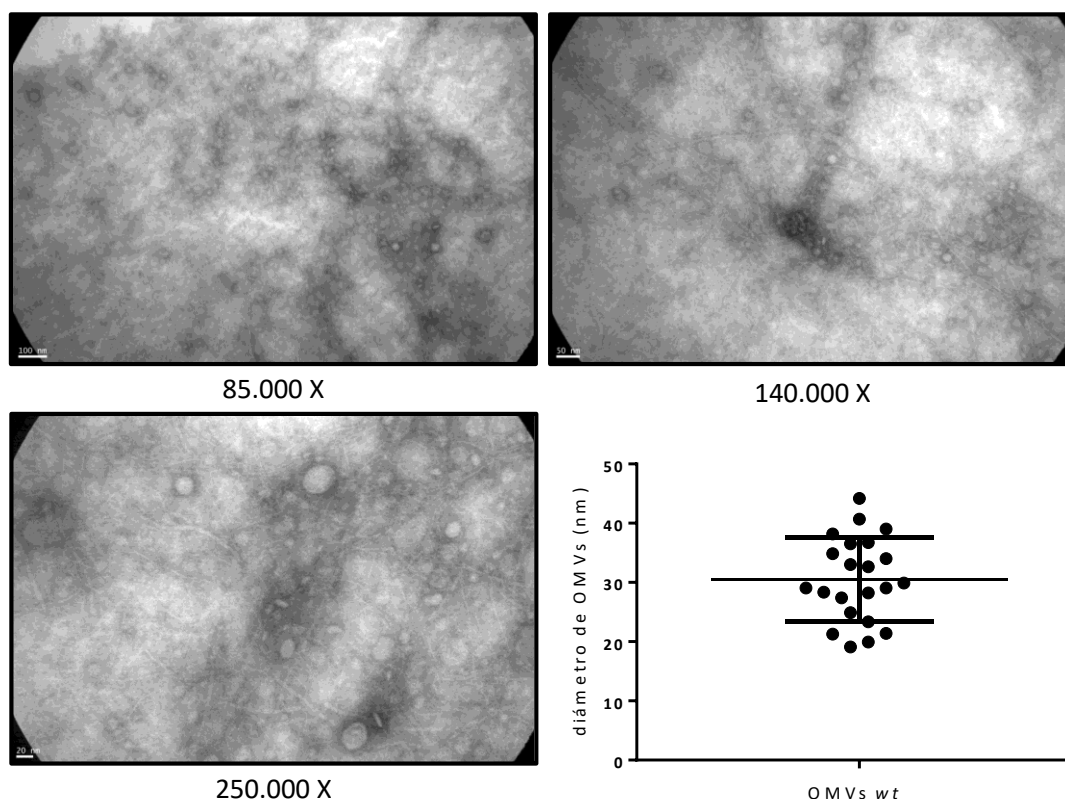


Figura IV.8. Visualización de OMVs salvajes por TEM. Se muestran tres campos representativos con distintas magnificaciones (85.000X; 140.000X; 250,000X). Las OMVs se prepararon a partir de la cepa salvaje de *Sma* cultivada en LB a 30°C hasta una $DO_{600} = 3$. Se cuantificó la concentración final de proteínas, y se diluyó la suspensión a 0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Luego, gotas de 5 μl de OMVs previamente fijadas se adsorbieron sobre grillas de carbono, y se tiñeron negativamente con acetato de uranilo 2% (p/v) (sección III.14.3). En el panel inferior derecho se muestra la distribución de diámetros de las OMVs. Las medidas se efectuaron sobre 22 vesículas visualizadas en tres campos diferentes. Se indica la media aritmética junto con el desvío estándar. La cuantificación se efectuó utilizando el software disponible en el microscopio electrónico.

IV.4. Estudio de la virulencia de OMVs sobre células CHO

IV.4.1. Efecto citotóxico dependiente de serralisina PrtA

Como se refirió en la Introducción, una de las numerosas funciones potenciales asignadas a las OMVs es actuar como vectores de transporte para factores de virulencia. De este modo, éstos pueden transportarse largas distancias en forma protegida y concentrada, para finalmente interaccionar específicamente con la célula blanco. En el reporte previo de McMahon *et al.* (123) se determinó que las OMVs producidas por *Sma* RM66262 resultaron tóxicas para larvas de *G. melonella* transcurridas 24 horas post inyección. En nuestro laboratorio, buscamos corroborar dicho resultado ensayando la toxicidad de las OMVs hacia células epiteliales de mamífero de la línea CHO. Se efectuaron ensayos de co-incubación de OMVs purificadas a partir de la cepa salvaje (OMVs wt) con una monocapa de células CHO, y

se incubó a 37°C durante un periodo de 20 horas. Luego, se cuantificó la citotoxicidad mediante el ensayo de MTT (328). Se observó efecto citotóxico dependiente de la dosis, entre los 2,5 y 25 µg/ml de OMVs (figura IV.9, panel superior izquierdo). En la parte inferior de la figura, se muestran micrografías de contraste de fase representativas del efecto citotóxico de las vesículas; éstas provocaron un fenotipo de redondeo celular y pérdida de adherencia a la placa de cultivo. En la parte superior derecha, se muestran las células CHO sometidas al tratamiento control que presentaron una morfología alargada y adherida a la superficie de la placa, indicativos de su integridad.

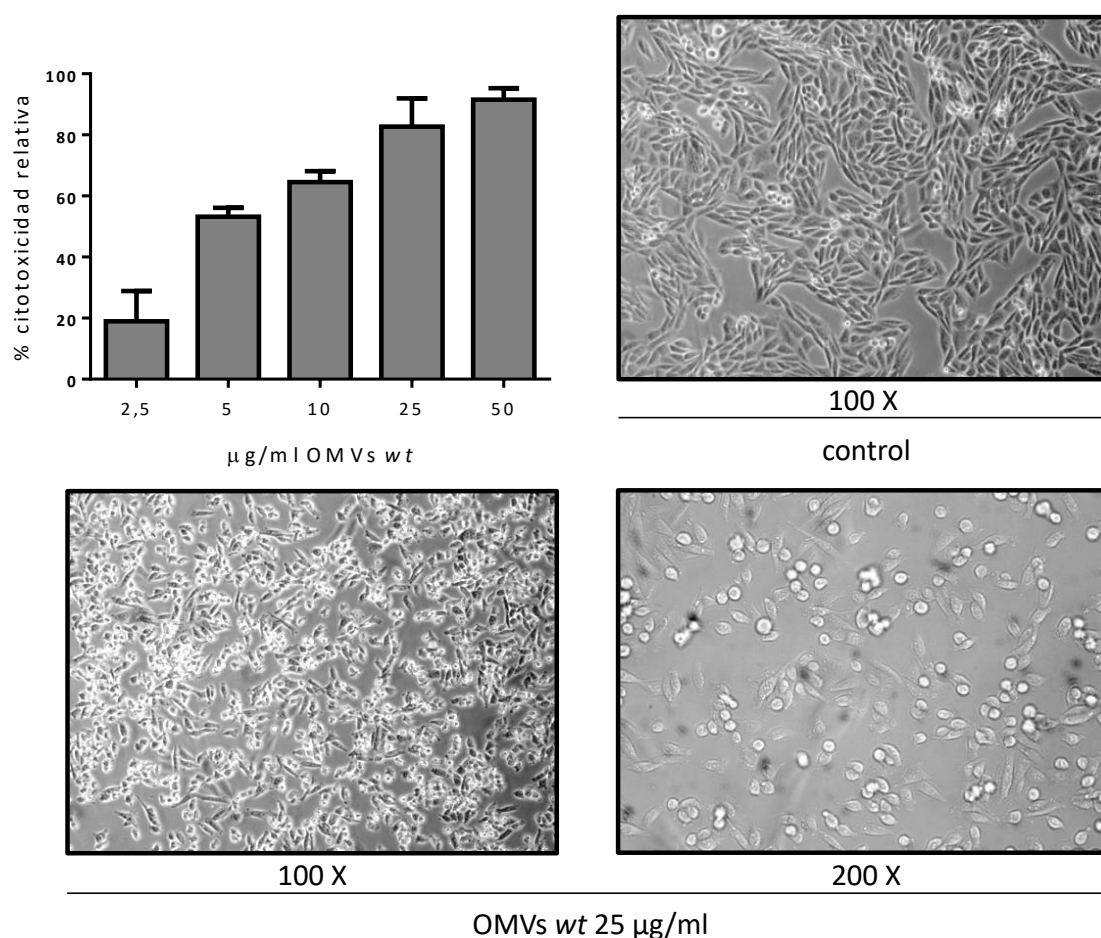


Figura IV.9. Daño citotóxico de OMVs sobre células CHO. *Sma wt* se cultivó en medio LB a 30° C hasta alcanzar una $DO_{600} = 3$. Se purificaron las OMVs mediante el protocolo optimizado descrito en III.14.1. Posteriormente, las OMVs se incubaron con una monocapa de células CHO a las concentraciones indicadas durante 20 horas a 37°C. En el panel superior izquierdo se indica la citotoxicidad relativa de cada muestra, determinada contra células CHO control tratadas con un volumen igual de buffer HEPES. Se indican los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. El protocolo se detalla en la sección III.17.1. Se muestran además micrografías de contraste de fase representativas, donde se pueden apreciar los cambios morfológicos sobre las células CHO inducidos por OMVs *wt*.

McMahon *et al.* (123) demostraron previamente que la citotoxicidad de OMVs en larvas de *G. melonella* es independiente de la presencia de LPS en las preparaciones. Sin embargo, en ese trabajo no se logró identificar cuál o cuáles eran los factores asociados a OMVs responsables del efecto tóxico. Como se mostró en la sección IV.2, en el análisis de las OMVs por LC-MS/MS se detectaron proteínas con roles en virulencia, como la hemolisina ShIA, la serralisina PrtA, la metaloproteasa SlpD, y fosfolipasa PhIA, entre otros. Por ende, conjeturamos que al menos uno de estos factores debería estar involucrado en el fenotipo observado.

La hemolisina ShIA demostró ser citotóxica para células epiteliales en cultivo (95). Sin embargo, en la bibliografía se ha descrito que la vida media de la actividad hemolítica de ShIA liberada en el medio de cultivo es de 2,5 min y que los sobrenadantes de cultivo no poseen actividad hemolítica (50; 51; Di Venanzio, tesis doctoral). Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la expresión de ShIA es responsable del fenotipo autofágico inducido por *Sma* desde el espacio extracelular (21). Una de las maneras de ensayar dicho fenotipo es co-incubar células de la línea CHO-EGFP-LC3 –la cual expresa que expresa de manera estable la proteína LC3 fusionada a GFP- con bacterias de la cepa salvaje de *Sma*. LC3 es una proteína asociada a microtúbulos considerada el principal marcador específico de autofagosomas, dado que durante la maduración de estos compartimentos la forma citosólica de esta proteína (LC3-I) sufre un procesamiento proteolítico C-terminal y se conjuga con fosfoetanolamina (LC3-II) quedando retenida en las membranas de los autofagosomas nacientes (330). Por ello, la inducción del proceso autofágico por parte de *Serratia* en células CHO-EGFP-LC3 se puede detectar fácilmente mediante la observación microscópica. Entre los 180 y 360 min post-infección, se evidencia a través la visualización de un patrón puntillado –correspondiente a la proteína de fusión- decorando las SeCVs en las células infectadas, en oposición a una distribución homogénea de la fluorescencia verde en células del control negativo. Por lo tanto, para evaluar si la hemolisina ShIA detectada en OMVs es biológicamente activa, ensayamos la incubación de OMVs *wt* a una dosis de 10 µg/ml con una monocapa de células de la línea CHO-EGFP-LC3. Sin embargo, no se detectaron señales del proceso autofágico entre los 180 y los 360 min post-incubación (resultados no mostrados), sugiriendo que ShIA podría estar asociada a vesículas en una forma inactiva, haciendo improbable su relación con el fenotipo citotóxico descrito previamente.

Las metaloproteasas PrtA y SlpD, otros dos factores detectados en OMVs en el estudio de LC-MS/MS, pertenecen a la misma familia de las serralisinas. Como se

describió en la Introducción, PrtA ha sido ampliamente estudiada como un factor de patogenicidad y es citotóxica frente a una variedad de líneas celulares (74–76). En tanto que SlpD está pobremente caracterizada: un único reporte (76) señaló que su sobreexpresión episomal no causó citotoxicidad de los filtrados de cultivo en comparación con el control. Por lo tanto, se hipotetizó que PrtA podría ser uno de los componentes responsables del efecto citotóxico de las OMVs. Para evaluar dicha conjetura, el primer paso fue la construcción de una mutante insercional en el gen *prtA* por recombinación sitio-dirigida del plásmido pKNOCK-Cm. Los detalles de la construcción se encuentran en la sección III.8.1 de Materiales y Métodos. Como se discutirá en detalle en el segundo capítulo de esta Tesis, la cepa mutante *prtA* no presentó alteraciones en su crecimiento respecto de la cepa parental; en cambio, sí mostró una severa disminución en su actividad proteolítica secretada, lo que indica la relevancia de la serralisina PrtA entre las proteasas secretadas por *Sma* RM66262. Posteriormente, se purificaron OMVs a partir de la mutante *prtA*. Se verificó que el perfil proteico de dicha preparación coincidiera con el de las OMVs *wt*, con excepción de la ausencia de una banda a 50 kDa, coincidente con el peso molecular de PrtA (figura IV.10.A). Asimismo, la inspección por TEM de vesículas de la cepa *prtA* mostró que su morfología general es similar a la observada para las OMVs *wt*. La cuantificación de los diámetros vesiculares demostró que no existen diferencias significativas de tamaño entre vesículas salvajes y las desprovistas de PrtA (figura IV.10; B y C). Finalmente, se incubaron vesículas *prtA* con células CHO en monocapa, y se observó que la citotoxicidad *in vitro* disminuyó en comparación con las OMVs obtenidas a partir de la cepa salvaje. Para una dosis de 25 µg/ml y tras 20 horas de incubación, la citotoxicidad de las OMVs *prtA* fue del 50%, en comparación con el 83% obtenido para las OMVs *wt*. Asimismo, las micrografías de células tratadas con OMVs *prtA* presentaron una morfología distendida, similar a la observada para las células control, (figura IV.10.E). Sin embargo, el incremento en la dosis de OMVs *prtA* a una dosis de 50 µg/ml, tuvo un aumento concomitante de la citotoxicidad cuantificada por MTT, lo que sugiere la presencia de otros factores citotóxicos distintos a PrtA. En conjunto, estos resultados muestran que la carga proteica de las OMVs resulta tóxica para células en cultivo. Entre el conjunto de componentes asociados a las vesículas, la serralisina PrtA sería un componente relevante que altera la viabilidad celular en el modelo ensayado.

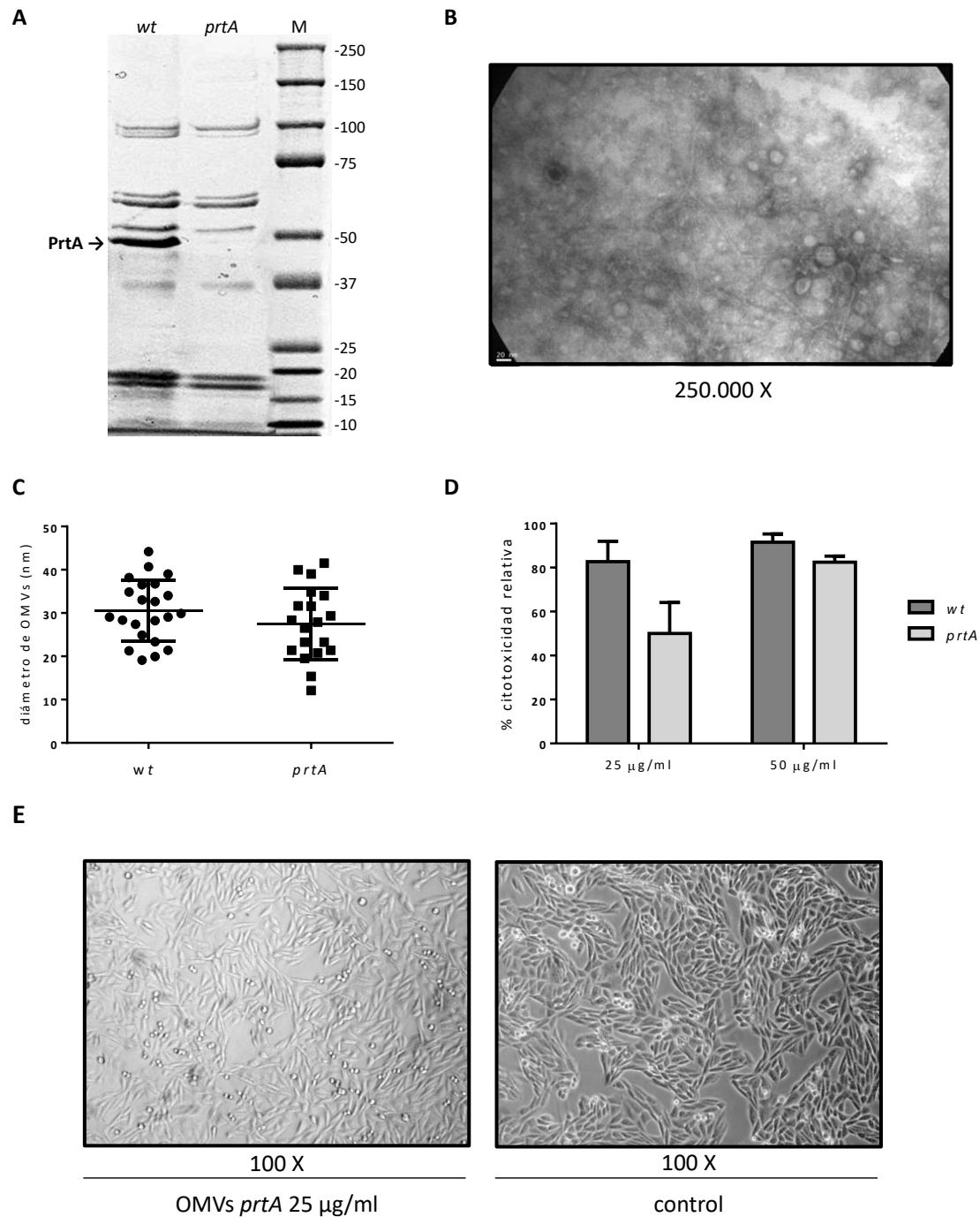


Figura IV.10. Estudio de las OMVs *prtA*. **A)** Comparación de los perfiles proteicos de OMVs *wt* y *prtA*. 5 µg de OMVs *wt* y *prtA* se sembraron en un gel de poliacrilamida 4-15%. A la derecha (M) se muestran las bandas correspondientes al marcador de peso molecular expresado en kDa. **B)** Micrografía electrónica de OMVs *prtA*. Se muestra una imagen representativa obtenida por TEM, con una magnitud de amplificación de 250.000 X. **C)** Análisis comparativo de tamaño entre OMVs *wt* y *prtA*. Se midieron los diámetros de 19 vesículas *prtA*, provenientes de tres campos diferentes. Se calculó la media y las desviaciones estándar y se las comparó con los valores obtenidos para vesículas *wt*, presentados previamente en la figura IV.8. **D)** Determinación de la citotoxicidad relativa. Se utilizó el método del MTT (Materiales y Métodos, sección III.17.1). Los valores indican la citotoxicidad relativa de cada muestra, determinada contra células CHO control tratadas con un volumen igual de buffer HEPES. Se indican los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. **E)** Micrografías de contraste de fase representativas, donde se puede apreciar la citotoxicidad atenuada de las OMVs *prtA*.

IV.4.2. Internalización de las OMVs

Como hemos referido en la Introducción, se ha demostrado la internalización de OMVs en líneas de células en cultivo, lo que sugiere que las vesículas son capaces de transportar y distribuir factores de virulencia durante la infección (106, 117, 331). En células no fagocíticas, existen cuatro vías principales de endocitosis: macropinocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, y endocitosis independiente de clatrina y de caveolina. Todas estas vías han sido implicadas en la entrada de OMVs, provenientes de diversas especies bacterianas, en la célula hospedadora (169).

Por esta razón, se propuso determinar si las OMVs de *Sma* son capaces de ingresar a las células, utilizando el modelo de monocapa de células no fagocíticas CHO. Con este objetivo, se co-incubaron células de dicha línea con OMVs *wt* purificadas y previamente marcadas con el fluoróforo lipofílico FM4-64 FX. El protocolo de marcaje se describe en la sección III.17.2 de Materiales y Métodos. La dosis de OMVs utilizada para este ensayo fue de 5 µg/ml. Dicho valor representó la dosis máxima de OMVs que no provocó un fenotipo de redondeo celular tras 20 horas post incubación, en los ensayos previos. Una vez transcurrido el periodo de tiempo indicado, se lavó exhaustivamente y se fijó la monocapa. Luego, se observaron las células mediante microscopía confocal de fluorescencia. La figura IV.I.11 muestra imágenes obtenidas luego de 120 min de coincubación. Las OMVs –visualizadas como un puntillado de color rojo– parecen localizar en el espacio intracelular, preferentemente en la región perinuclear, mientras que no se detectaron señales fluorescentes en las células control tratadas con dosis equivalentes de OMVs sin marcar. Por otro lado, la presencia de OMVs dentro de las células también pudo ser detectada en una magnitud similar luego de un periodo de 20 horas de coincubación, indicando la persistencia de las vesículas en el espacio intracelular.

La internalización de OMVs y su localización perinuclear ha sido reportada para OMVs secretadas por otros patógenos, como *Escherichia coli* enterohemorrágica (332), *Pseudomonas aeruginosa* (168), y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (130), entre otros, sugiriendo la existencia de mecanismos similares para el tráfico de OMVs en células epiteliales. Estos resultados sugieren un modelo en el que, luego de la entrada de las vesículas a las células hospedadoras, la serralisina PrtA asociada a OMVs degradaría moléculas relevantes para la función y la estructura celular, causando el efecto citotóxico descripto. Así, las OMVs de *Sma* funcionarían como vehículos potentes para la transmisión de sus factores de virulencia. Se propone la

realización a futuro de experimentos de colocación de OMVs con marcadores celulares de la vía endocítica, degradativa y/o autofágica, para caracterizar en detalle este proceso; así como también el análisis de la internalización utilizando vesículas *prtA*, para verificar que dicho factor no esté interviniendo en dicho proceso.

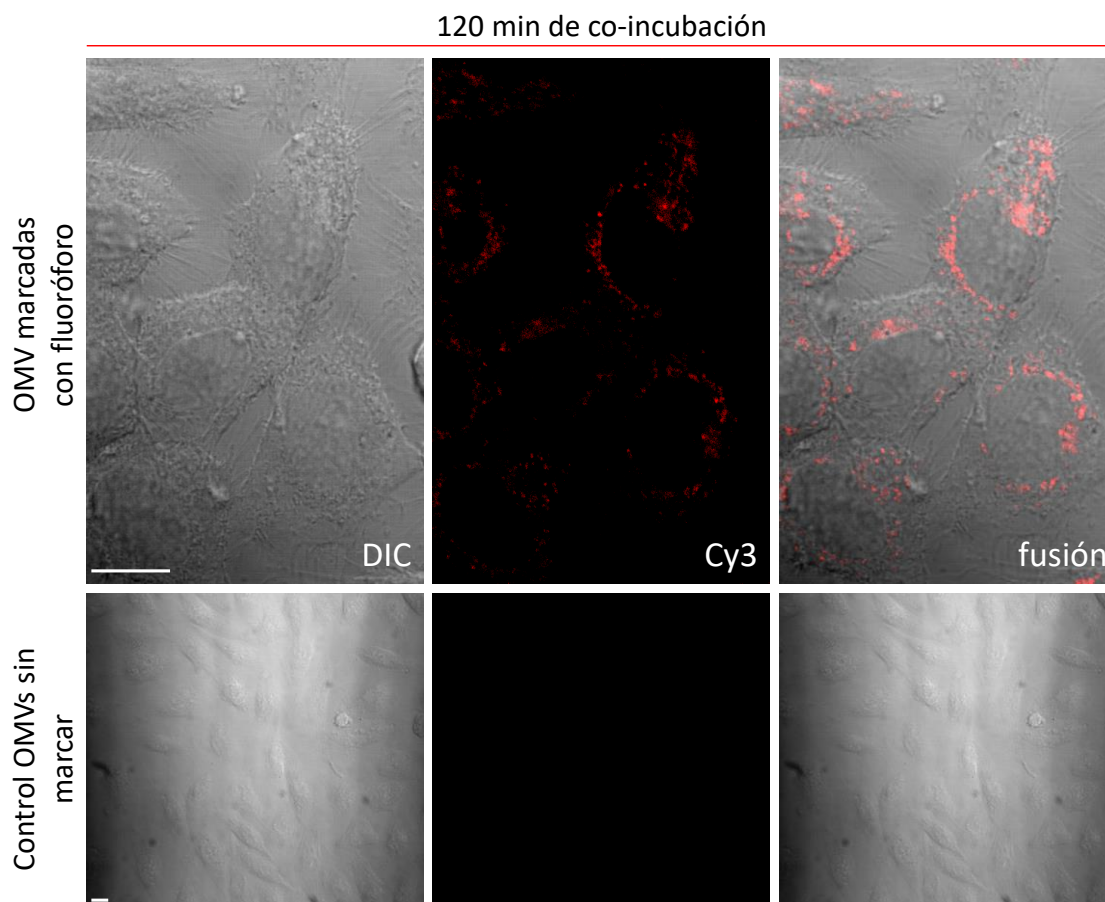


Figura IV.11. Visualización de OMVs marcadas *in vitro* en el espacio intracelular de células CHO. OMVs *wt* se marcaron utilizando con FM4-64 FX, según el protocolo descrito en la sección III.17.2. Se determinó la concentración de proteína en las vesículas marcadas, y se las co-incubó con una monocapa células CHO. Como control, se co-incubaron células CHO con OMVs *wt* sin marcar. Una vez transcurrido el periodo de incubación, las células se lavaron, se fijaron, y se analizaron bajo el microscopio confocal de fluorescencia Nikon Eclipse TE-2000-E2, utilizando el programa EZ-C1. Barras: 10 μ m.

IV.5. Estudio de la virulencia de OMVs en *Drosophila melanogaster*

A partir del año 2013 se estableció una colaboración científica entre el grupo de la Dra. García Vescovi y el grupo del Dr. Dominique Ferrandon (UPR 9022, IBMC, Universidad de Estrasburgo, Francia). El grupo francés es experto en los mecanismos de inmunidad desplegados por *D. melanogaster*, organismo para el cual *Sma* representa un potente patógeno (25, 275, 333, 334). La colaboración tuvo como objetivo general abordar el estudio de procesos biológicos desplegados tanto por el patógeno como por el organismo hospedador durante el proceso infeccioso.

Como se describió en la Introducción, la respuesta inmune de *D. melanogaster* se encuentra bien caracterizada, contando con mecanismos de defensa sistémicos a nivel humoral y celular, así como también mecanismos de inmunidad a nivel local, por ejemplo, en el intestino (249). *Sma* introducida en la hemolinfa de las moscas es capaz de replicarse y es insensible tanto a la respuesta inmune sistémica, mediada esencialmente por los péptidos microbicidas, como a la respuesta inmune celular, es decir, fagocitosis a través de los hemocitos. Como resultado, las moscas sucumben dentro de las 24 horas p.i. (post inyección) (25). En contraste, en el modelo de infección oral, *Sma* ingerida no mata a las moscas rápidamente. En cambio, induce un daño en el epitelio intestinal –dependiente de la acción de ShlA– que es compensado por un incremento en la tasa de proliferación de las células madre intestinales (334). Algunas bacterias son capaces de escapar del tracto digestivo; sin embargo, son controladas por la respuesta inmune celular. Cuando dicha respuesta se encuentra impedida, por ejemplo, por saturación previa de la maquinaria fagocítica causada por inyección de perlas de látex no degradables o por mutantes deficientes en dicho proceso, las moscas sucumben más rápidamente durante la infección, debido a una bacteremia extensiva (25).

En particular, durante mi estadía de seis meses realizada durante el año 2015 en el laboratorio francés financiada por el programa “BEC.AR”, se abordó principalmente la utilización del *Drosophila melanogaster* como modelo *in vivo* para evaluar el potencial patogénico de las OMVs. Los resultados de dichos ensayos se recopilan a continuación.

IV.5.1. Efecto deletéreo de las OMVs dependiente de serralisina PrtA

En primer término, se ensayó el efecto de la microinyección de OMVs en distintas dosis en la hemolinfa de insectos adultos. Las vesículas fueron aisladas a partir de cultivos de la cepa salvaje de *Sma* cultivada a 30°C durante 16 horas. El protocolo de microinyección se describe detalladamente en la sección III.18.1. Como observamos en la figura IV.12, se determinó que para una dosis de 0,6 µg/µl de OMVs (equivalente a 41,4 ng de proteína total), las moscas sucumbieron dentro de las primeras 3 horas p.i. La administración de una dosis de 0,4 µg/µl provocó la muerte de más de la mitad de las moscas a las tres horas de comenzado el ensayo; posteriormente, el porcentaje de supervivencia se estabilizó, con un tercio de la población permaneciendo viva a las 22 horas. Asimismo, el ensayo con dosis menores de OMVs (0,1-0,3 µg/µl) mostró una subpoblación sucumbiendo dentro de las primeras 5 horas y otra subpoblación sobreviviente. Para descartar la posibilidad de que el LPS

estuviera ejerciendo un efecto tóxico, se microinyectó una suspensión de membrana externa, preparada a partir de las mismas bacterias de las cuáles se aislaron las OMVs, según el protocolo descrito en la sección III.11.3. Como resultado, se observó que la administración de esta preparación no causó mortalidad en comparación con el grupo control microinyectado con el buffer de resuspensión de las vesículas (control ME vs. Control buffer), mostrando que la acción tóxica de las OMVs sería independiente del LPS, y por ende, provocada por proteínas de la carga vesicular. Por otro lado, no se detectaron eventos de muerte significativos entre las 24 y las 48 horas.

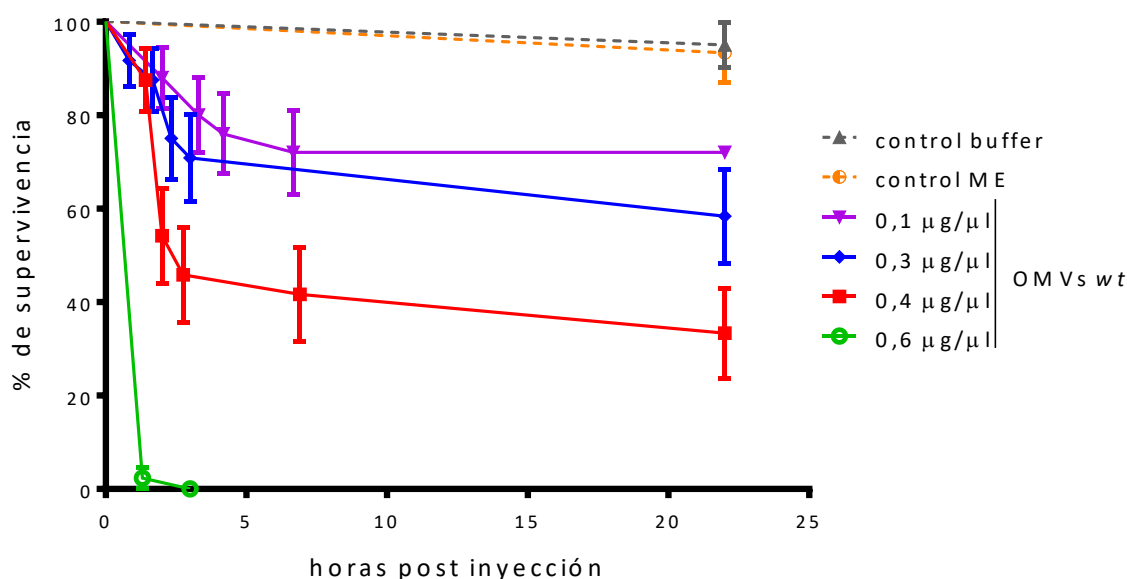


Figura IV.12. Supervivencia de insectos microinyectados con diferentes dosis de OMVs wt. Cohortes de 20 insectos hembra adultos de la línea salvaje A5001 fueron microinyectados con 69 nl de OMVs wt a la concentración indicada (Materiales y Métodos; sección III.18.1). Las curvas representan el promedio de supervivencia de tres réplicas biológicas. Como controles, al grupo “control buffer” se administró 69 nl de buffer HEPES 50 mM pH 7,5; al grupo “control ME”, se administró un preparado de membrana externa a 0,6 µg/µl. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En base a los resultados obtenidos en células de la línea CHO mostrados en la sección anterior, se prepararon OMVs carentes de PrtA a partir de la correspondiente cepa mutante cultivada a 30°C durante 16 horas, y se comparó su toxicidad con las OMVs wt. Los resultados se muestran en la figura IV.13. Para la dosis de 0,4 µg/µl las OMVs prtA resultaron inocuas, obteniendo niveles de supervivencia similares a los del grupo control. Para la dosis de 0,6 µg/µl, no se observó el efecto de muerte rápida provocado por una dosis equivalente de OMVs wt, sino que el TL50 (tiempo que transcurre hasta que el 50% de los individuos mueren) fue de 13 horas, con una supervivencia al final del experimento del 35%. Estos resultados sugieren que PrtA sería el factor responsable de la muerte rápida de los insectos inducida por las OMVs.

Sin embargo, a altas dosis de OMVs *prtA* evidenciamos la acción de otros factores tóxicos transportados en las vesículas.

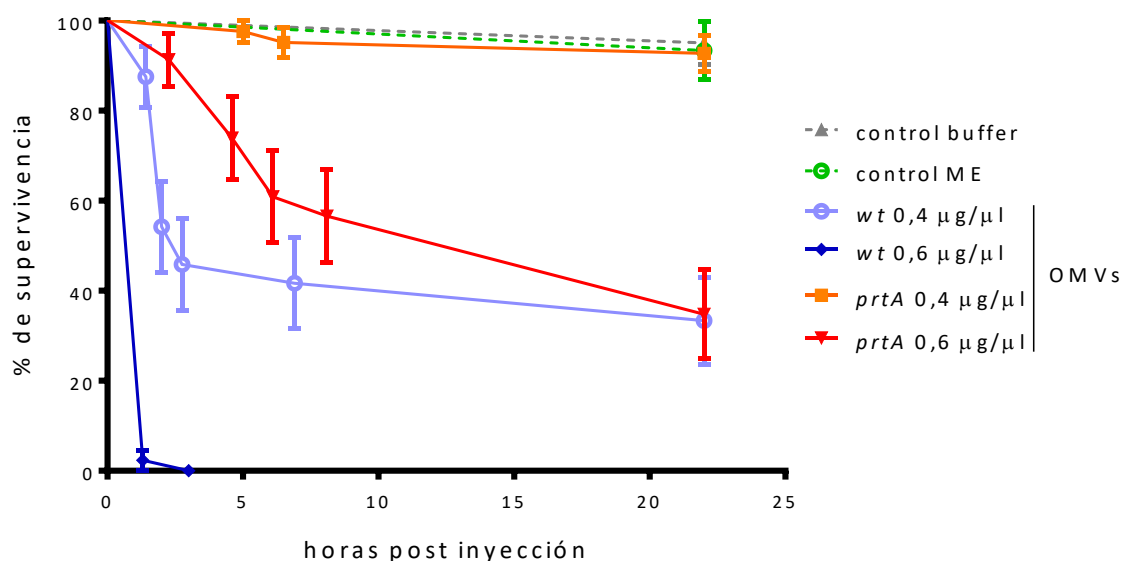


Figura IV.13. Supervivencia de insectos microinyectados con OMVs wt u OMVs *prtA*. Cohortes de 20 insectos hembra adultos de la línea salvaje A5001 fueron microinyectados con 69 nl de OMVs wt o *prtA* a la concentración indicada. Las curvas representan el promedio de supervivencia de tres réplicas biológicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En comparación, nuestros resultados indican un fenotipo de muerte en *Drosophila* más rápida que lo descritos previamente para larvas de *Galleria melonella* inyectadas con una dosis establecida de OMVs wt, las cuales sucumben dentro de las primeras 24 horas (123). A nuestro entender, la utilización del insecto *Drosophila melanogaster* como modelo para evaluar el potencial tóxico de OMVs no ha sido reportada previamente para ningún patógeno.

IV.5.2. Modulación de la respuesta inmune sistémica en respuesta a OMVs

Numerosos estudios han demostrado que las OMVs pueden ser detectadas por el sistema inmune del hospedador, actuando como señuelos antigénicos que disminuyan la concentración efectiva de factores de inmunidad humorales, y también actuando como señales disparadoras de la respuesta inflamatoria por medio de sus PAMPs. (108).

Como se refirió en la Introducción, uno de los mecanismos centrales de defensa en *Drosophila* es la síntesis y secreción de AMPs (péptidos antimicrobianos) inducidos naturalmente tras una infección microbiana. Estos péptidos se producen fundamentalmente en los cuerpos grasos (*fat bodies*) y son secretados hacia la hemolinfa, donde se acumulan y combaten al patógeno invasor. Este mecanismo se

denomina “respuesta inmune sistémica”, y constituye una de las reacciones inmunes mejor estudiadas en *Drosophila* (249). La expresión de los genes codificantes de AMPs depende de dos vías de señalización: la vía Imd y la vía Toll. Con el objeto de comprobar si las OMVs de *Sma* son capaces de inducir este tipo de defensa en el insecto adulto, se estudiaron los niveles de expresión de dos genes codificantes para AMPs: *Diptericina*, cuya expresión se encuentra modulada por la vía Imd, y *Drosomicina*, clásicamente activado por la vía Toll. Se inyectaron moscas de la línea salvaje A5001 con OMVs *wt* a las dosis de 0,2 µg/µl y 0,3 µg/µl. 6 horas p.i. se recolectaron los individuos sobrevivientes y se aisló ARN a partir del cuerpo entero del insecto, según se describe en la sección III.3.3.a.

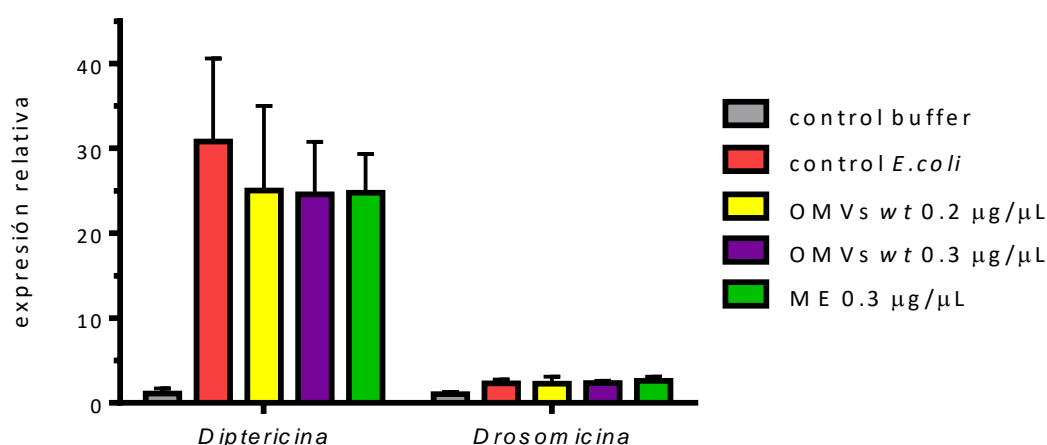


Figura IV.14. Inducción de los genes *Diptericina* y *Drosomicina* en adultos de *Drosophila* microinyectados con preparaciones de vesículas salvajes (OMVs *wt*) o membrana externa (ME). Insectos salvajes de la línea A5001 se microinyectaron con 69 nl de OMVs a la dosis indicada. La condición control del ensayo fueron insectos inyectados 69 nl de buffer HEPES 50 mM pH 7,5. Como control positivo, se infectaron las moscas con una suspensión concentrada de *E. coli*. 6 horas post inyección, se extrajo ARN a partir de la totalidad del cuerpo de la mosca, se cuantificó y normalizó la cantidad de ARN, y se procedió a efectuar protocolos estándar de RT-qPCR (detalle en Materiales y Métodos, sección III.3.6). Los valores de expresión se obtuvieron por método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, y son relativos al grupo control tratado con buffer HEPES. Se utilizó a *Rp49* como gen de referencia. Cada columna representa el promedio de seis replicas biológicas, consistentes cada una de 5 moscas hembras adultas. Las barras de error indican la desviación estándar.

La figura muestra que la microinyección de OMVs *wt* aumentó la expresión de *Diptericina* un promedio de 25 veces en comparación con el tratamiento control, para ambas dosis ensayadas. Asimismo, una cantidad equivalente en proteína de un preparado de membrana externa (ME) fue capaz de inducir la expresión de este gen en una magnitud similar a las OMVs, indicando que serían componentes comunes entre las vesículas y la membrana externa los responsables de la inducción cuantificada de la respuesta inmune. Como se desarrolló en la Introducción, la vía IMD

es activada tras el sensado de fragmentos de PG del tipo DAP; según los modelos de biogénesis de OMVs, estos componentes se incorporarían el lumen de las vesículas.

Con respecto a la vía Toll, se observó una inducción de menor magnitud para todos los tratamientos ensayados. Ambas dosis de OMVs también aumentaron la expresión de *Drosomicina* en un promedio de 2,3 veces en comparación con el tratamiento control; en tanto que la microinyección de ME provocó un aumento de 2,6 veces. El control de inyección con *E. coli* produjo una modulación de la expresión similar al causado por las vesículas. Se ha demostrado previamente que bacterias Gram negativas, como *E. coli*, son capaces de producir un aumento moderado de la vía Toll, obteniendo un pico máximo de activación a tiempos más tardíos que los ensayados aquí (alrededor de las 10 horas luego de la infección)(249). En estos casos, se desconoce cuál es la señal activadora para el sistema Toll. Se hipotetiza que, de modo similar a lo que ocurre con proteasas fúngicas, proteasas secretadas por las bacterias Gram negativas podrían activar esta vía a través de la activación de la serina proteasa Persephone, presente en la hemolinfa del insecto (254). En base a nuestros resultados, la activación sería independiente de PrtA, debido a que los estudios por LC-MS/MS no detectaron dicha proteína en el preparado de membrana externa. Por lo tanto, conjeturamos que en la activación de Toll intervendrían componentes proteicos comunes entre las vesículas y la membrana externa, entre ellos, las aminopeptidasas PepA y PepB.

En paralelo, se comparó la supervivencia entre insectos salvajes y deficientes genéticamente para una u otra vía. Para analizar la vía Imd, se utilizó la mutante CnBw/*Imd* derivada de la línea salvaje CnBw. Imd es una proteína adaptadora necesaria para la transducción de la señal en la vía homónima (Introducción, figura I.3). Se observó que para una dosis de OMVs de 0,3 µg/µl, los insectos con genotipo salvaje (CnBw) presentan, a las 24 horas p.i., una supervivencia promedio del 48%, contra un 11% de supervivencia para la línea mutantes CnBw/*Imd*. La inyección de una dosis equivalente de OMVs *prtA* no produjo mortalidad significativa para ninguna de las dos líneas ensayadas.

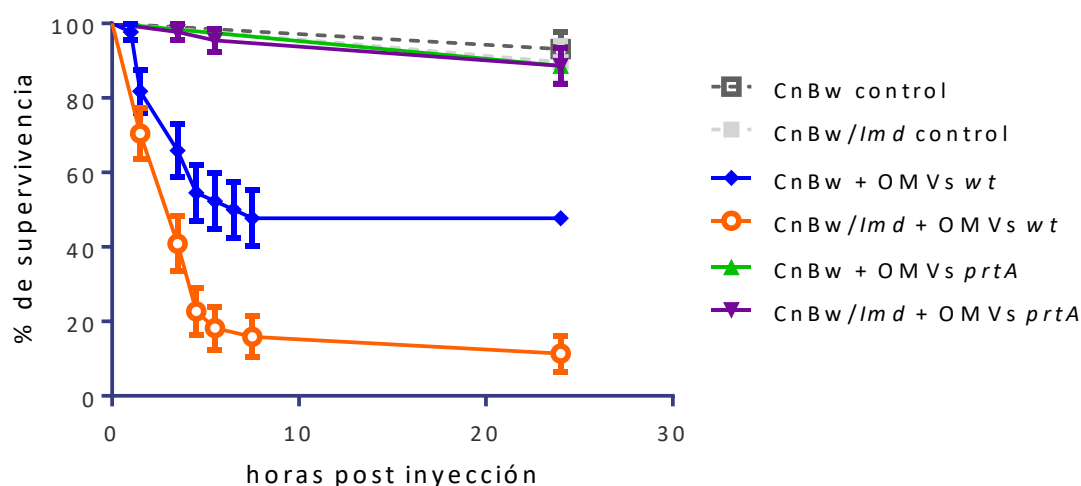


Figura IV.15. Supervivencia de insectos salvajes CnBw e insectos inmunodeficientes CnBw/Imd microinyectados con OMVs wt. Se microinyectaron cohortes de 15 insectos hembra adultos con 69 nl de una suspensión de OMVs wt de 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Como tratamiento control, se inyectó el buffer HEPES. Las curvas representan el promedio de supervivencia de tres réplicas biológicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En otra serie de experimentos, se ensayó la susceptibilidad de una segunda mutante en vía IMD, denominada CnBw/Kenny, carente de la proteína IKK γ . Ésta forma parte del complejo de señalización IKK, que sería el responsable de fosforilar y activar al factor de transcripción Relish, encargado de modular la expresión de los genes de respuesta inmune antibacteriana (249). La figura IV.16 muestra que el 87% de los insectos tratados Kenny murieron luego de las 28 horas p.i.; contra una tasa de deceso promedio del 37% para la línea parental en el punto final del experimento.

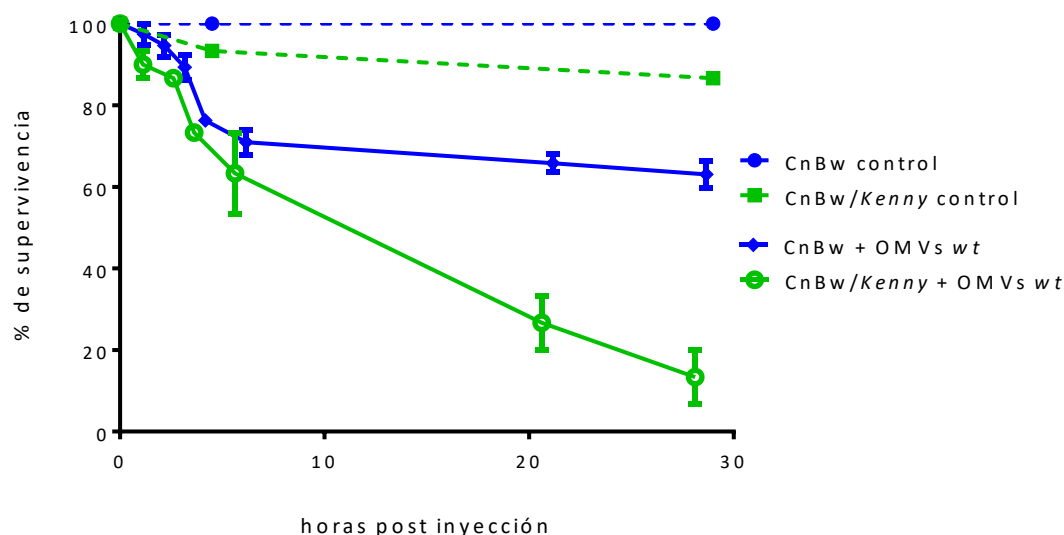


Figura IV.16. Supervivencia de insectos salvajes CnBw e insectos inmunodeficientes CnBw/Kenny microinyectados con OMVs wt. Se microinyectaron cohortes de 15 insectos hembra adultos con 69 nl de una suspensión de OMVs wt de 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Las curvas representan el promedio de supervivencia de tres réplicas biológicas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

Por otro lado, para estudiar la implicancia de la vía Toll, se utilizó una línea mutante para la proteína adaptadora Myd88, A5001/Myd88. Myd88 actúa junto a las proteínas Tube y Pelle en la transducción de la señal corriente abajo del receptor de membrana Toll dimerizado y activado (249). Los resultados de los ensayos (figura IV.17) indicaron que la línea A5001/Myd88 presentó mayor susceptibilidad a la inyección de vesículas salvajes, alcanzando una tasa de mortalidad promedio del 60% a las 4 horas p.i., en comparación con un 20% de mortalidad para la línea parental. OMVs *prtA* no provocaron mortalidad en la línea salvaje, a la dosis ensayada. Por el contrario, las mismas vesículas fueron tóxicas en la línea A5001/Myd88, con una tasa de supervivencia del 83% a las 4 horas p.i., que disminuyó al 41% a las 48 horas p.i. Esta susceptibilidad a una dosis subletal de OMVs *prtA*, sugiere que la integridad de la vía Toll es necesaria para proveer protección contra componentes vesiculares distintos a PrtA.

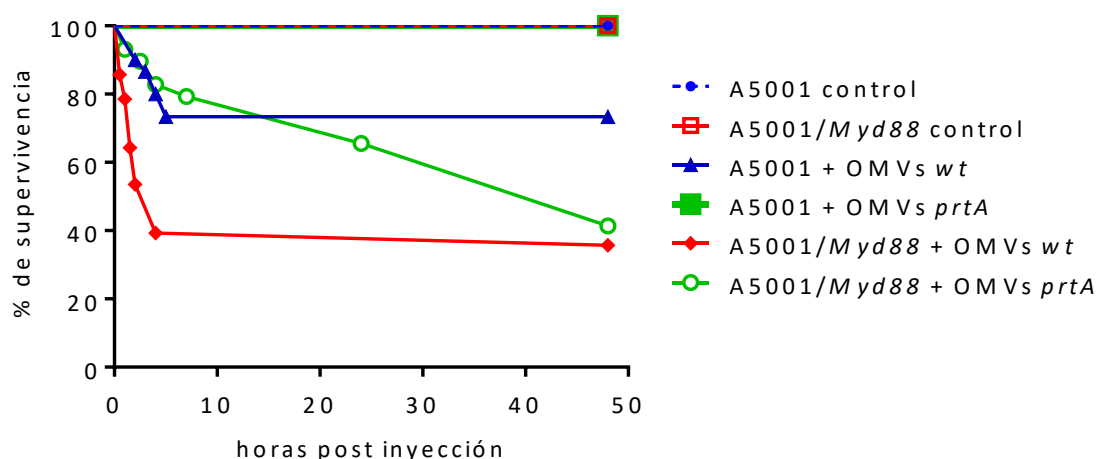


Figura IV.17. Supervivencia de insectos salvajes A5001 e insectos inmunodeficientes A5001/Myd88 microinyectados con OMVs wt u OMVs prtA. Se microinyectaron cohortes de 15 insectos hembra adultos con 69 nl de una suspensión de 0,3 µg/µl de OMVs (*wt* o *prtA*). Las curvas representan el promedio de supervivencia de tres réplicas biológicas. Notar que las curvas correspondientes a los tratamientos control se superponen con la curva correspondiente al grupo “A5001 + OMVs *prtA*”, dado que presentaron el mismo % de supervivencia. Para una interpretación más clara del gráfico, se suprimieron las barras de error.

A partir de los resultados expuestos en esta sección podemos concluir que las OMVs activan las vías de inmunidad sistémica Imd y Toll, las cuales proveen un grado de protección contra las OMVs. Posiblemente, las vesículas se conviertan en blanco de los AMPs, los cuales actuarían en detrimento de la integridad de las OMVs mediante un mecanismo de formación de poros en la membrana. Complementaria o alternativamente, otros productos génicos no caracterizados podrían inducirse mediante estas vías de señalización. Se puede conjeturar la existencia de un subgrupo

de genes co-regulados por ambas vías que serían necesarios para montar una adecuada respuesta defensiva ante las OMVs. De acuerdo a los elementos en *cis* (sitios $\kappa\beta$) que estén presentes en sus promotores, los genes que codifican para péptidos antimicrobianos serán más sensibles a la cascada de señalización Toll (ej.: *Drosomicina*), a la cascada Imd (ej.: *Diptericina*), o bien estarán co-regulados (249).

IV.5.3. Desregulación de la homeostasis de ROS provocada por OMVs

Además de la producción de AMPs, otro de los mecanismos de defensa descriptos para *Drosophila* –que también encontramos en mamíferos– es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), capaces de causar daño celular sobre el agente infeccioso (335). En *D. melanogaster*, la producción de ROS se ha reportado fundamentalmente a nivel de la inmunidad epitelial en el intestino, donde la proteína Duox sintetiza las ROS, y la catalasa IRC es la encargada de la detoxificación: así, un delicado equilibrio de generación-eliminación de estas especies moleculares es fundamental para mantener la homeostasis, dado que su sobreproducción resulta detrimental para las células del propio hospedador (249, 336). En el contexto de la interacción OMVs-hospedador, se reportó que vesículas aisladas a partir de *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* serían capaces de inducir daño oxidativo sobre células en cultivo (337, 338). Para ensayar esta posibilidad en nuestro modelo, decidimos ensayar si la supervivencia de los insectos a las OMVs se modificaba al contrarrestar químicamente las ROS. Para ello, co-administramos las vesículas y N-acetilcisteína (NAC). La NAC, precursor sintético de la cisteína y el glutatión intracelular, funciona como compuesto antioxidante, y su actividad anti-ROS resulta de sus propiedades para captar radicales libres, directamente a través del potencial redox de sus grupos tioles, o indirectamente mediante el incremento de los niveles de glutatión intracelular. La co-administración de OMVs con 50 mM NAC, logró rescatar parcialmente el efecto deletéreo provocado por la microinyección de OMVs *wt*, incrementando la tasa de supervivencia desde un 22% a un 53% a las 27 horas p.i. (figura IV.18). Una concentración de NAC 20 mM, en cambio, sólo aumentó muy modestamente el porcentaje de supervivencia en las primeras 10 horas p.i. En base a este resultado, hipotetizamos que la microinyección de OMVs en la hemolinfa *Drosophila* provocaría una desregulación en la homeostasis de ROS, incrementando el daño oxidativo, con consecuencias deletéreas para el insecto.

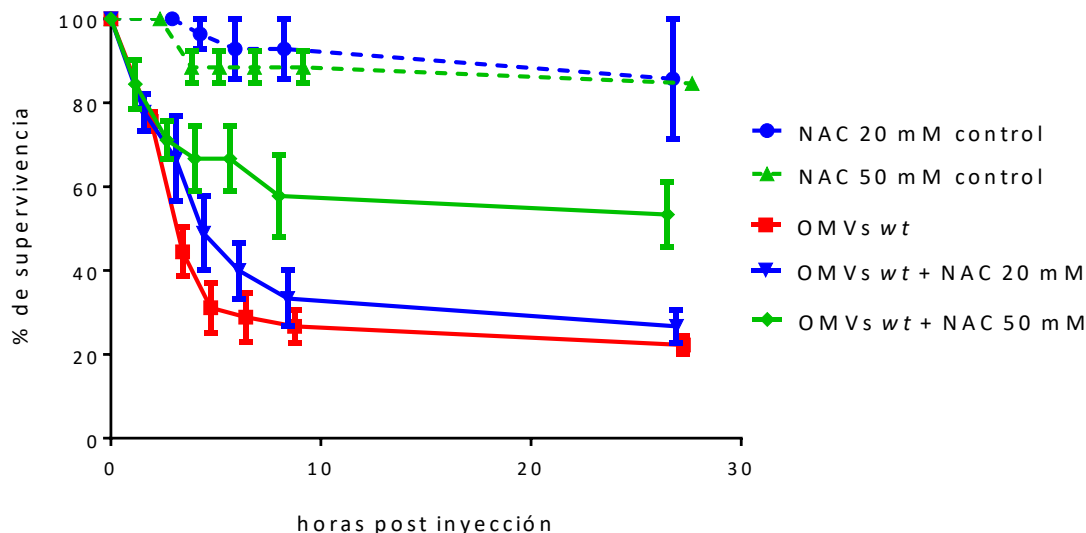


Figura IV.18. Supervivencia de insectos salvajes A5001 microinyectados con OMVs wt o con OMVs wt co-administradas con N-acetilcisteína (NAC). La dosis de OMVs wt utilizada para el ensayo fue de 0,4 µg/µl. Las vesículas fueron administradas solas, o mezcladas inmediatamente antes de la inyección con las concentraciones indicadas de NAC. Como controles, se incluyeron moscas microinyectadas con 69 nl de NAC a las concentraciones señaladas. Las curvas representan el promedio de tres replicas biológicas, consistentes cada una de 15 insectos hembra adultos.

Como se señaló en la Introducción, Lee *et al.* (246) han descrito en *Drosophila* un proceso de respuesta sistémica a la herida redox dependiente, en el cual tras un trauma físico (como una herida de magnitud) se activa la serina proteasa Haya. A su vez, Haya procesa proteolíticamente a la pro-fenoloxidasa (pro-PO) en fenoloxidasa (PO), necesaria para que curse la melanización en el sitio de la herida, así como también para incrementar los niveles de ROS en la hemolinfa (Introducción; figura I.4). De este modo, la línea de insectos *Haya* posee una capacidad disminuida para la producción endógena de ROS durante eventos infectivos o de herida sistémica. Las mutantes son especialmente sensibles al trauma, fenotipo que puede ser parcialmente rescatado mediante la inyección de paraquat o incrementando genéticamente la presencia de ROS en la hemolinfa. Las ROS producidas tras el daño tegumentario actúan asimismo como segundos mensajeros, iniciando un programa citoprotectivo mediado por señalización de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) en las neuronas.

Se ensayó entonces la susceptibilidad de la línea $W^{1118}/Haya$ al tratamiento con OMVs. En la figura IV.17, observamos que, en el punto final del ensayo, el 96 % de los insectos de la cepa salvaje (W^{1118}) sucumbieron, mientras que aquellos de la línea mutante *Haya* presentaron una tasa de supervivencia del 40%. Asimismo, la co-administración de OMVs con NAC mejoró la tasa de supervivencia de los insectos *Haya* entre las 5 y las 20 horas p.i., lo que indicaría la posibilidad de vías adicionales de producción sistémica de ROS que serían independientes de la acción de Haya.

Sin embargo, el porcentaje de supervivencia de los insectos en el punto final del ensayo fue similar. Por otra parte, la supervivencia de ambas líneas ensayadas con OMVs *prtA* fue similar a la supervivencia del grupo control. En conjunto, estos resultados señalarían que las OMVs inyectadas en la hemolinfa provocarían desbalance sistémico de ROS en el hospedador, que sería dependiente de la acción de la serralisina *PrtA* asociada a las OMVs.

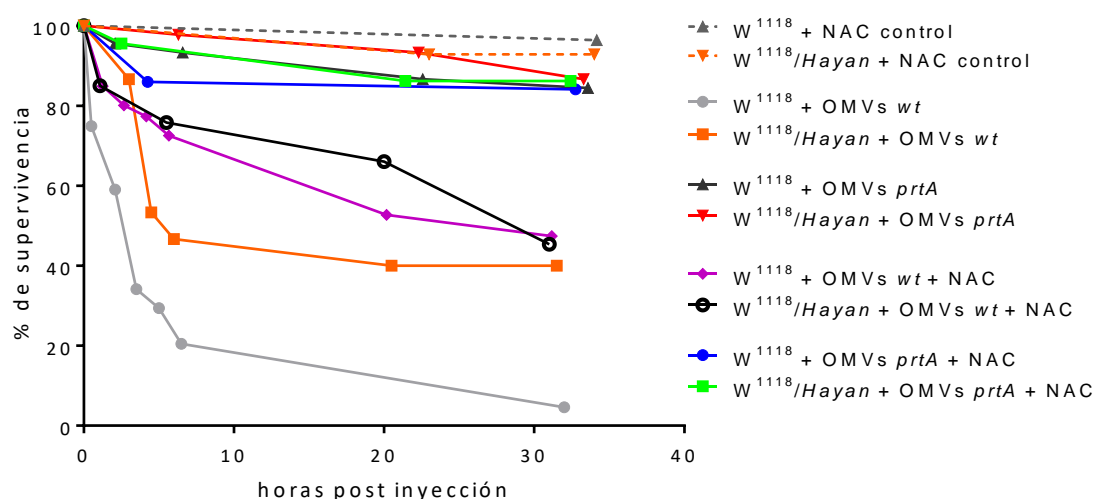


Figura IV.19 Supervivencia de insectos salvajes (W^{1118}) o mutantes ($W^{1118}/Hayan$) microinyectados con OMVs *wt* u OMVs *prtA*, con o sin co-administración de NAC. La dosis de OMVs utilizadas para el ensayo fue de 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La concentración de NAC fue de 50 mM. Las curvas representan el promedio de tres replicas biológicas consistentes de 15 insectos adultos. Para una mejor interpretación del gráfico, se suprimieron las barras de error. El experimento se realizó dos veces más con resultados similares.

Posteriormente, se inactivó la vía de señalización JNK, mediante la expresión en tejidos neuronales de un ARN de interferencia para el transcripto del gen *kayak*, codificante del factor de transcripción D-Fos, que actúa corriente debajo de la vía JNK (339). El procedimiento se describe en la sección III.18.3. Para ello, se utilizó el sistema Gal4-UAS, en el cual una línea que expresa la proteína Gal4 sólo en neuronas (Elav-Gal4) se cruzó con una línea codificante para el ARN de interferencia específico (Kayak ARNi). El experimento se realizó en colaboración con la Dra. Di Venanzio.

Como se indica en la figura IV.20, el bloqueo de la vía JNK disminuyó significativamente la mortalidad de los insectos durante las primeras 8 horas del experimento, con ambas dosis de OMVs ensayadas. Posteriormente, a las 24 horas p.i., la supervivencia de este grupo disminuyó hasta un valor promedio del 10%. Este resultado, en conjunto con los anteriores, sugiere que las OMVs modularían una vía de respuesta al trauma, normalmente protectora para el insecto, convirtiéndola en un mecanismo detrimental para el hospedador. El rescate de la supervivencia mediado por NAC señalaría que éste podría ocurrir como consecuencia de una generación

desmedida de las ROS que, en vez de actuar como segundo mensajeros neuronales, activarían en exceso la vía JNK en estas células y provocarían el efecto adverso.

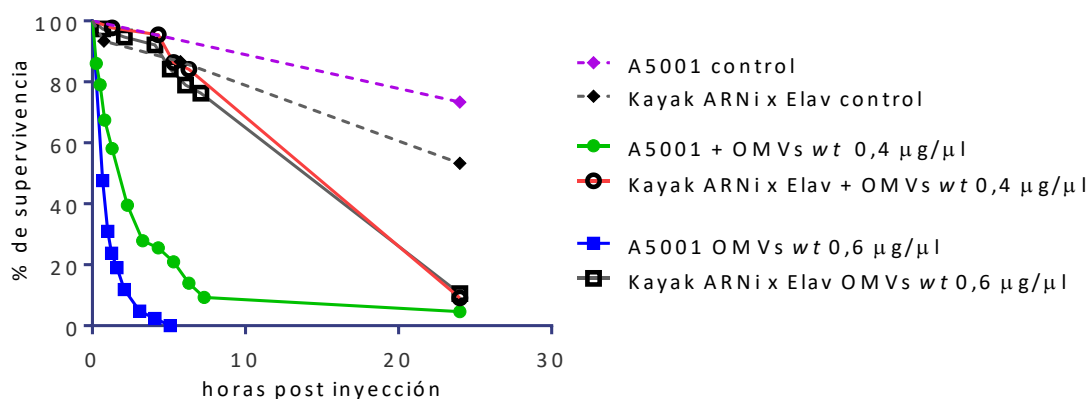


Figura IV.20. Supervivencia de insectos salvajes (A5001) o con la vía JNK bloqueada a nivel neuronal (Kayak ARNi x Elav). Se microinyectaron 69 nl de OMVs wt a la dosis indicada. Las curvas representan el promedio de tres replicas biológicas consistentes de cohortes 15 insectos adultos cada una. Para una interpretación más clara del gráfico, se suprimieron las barras de error.

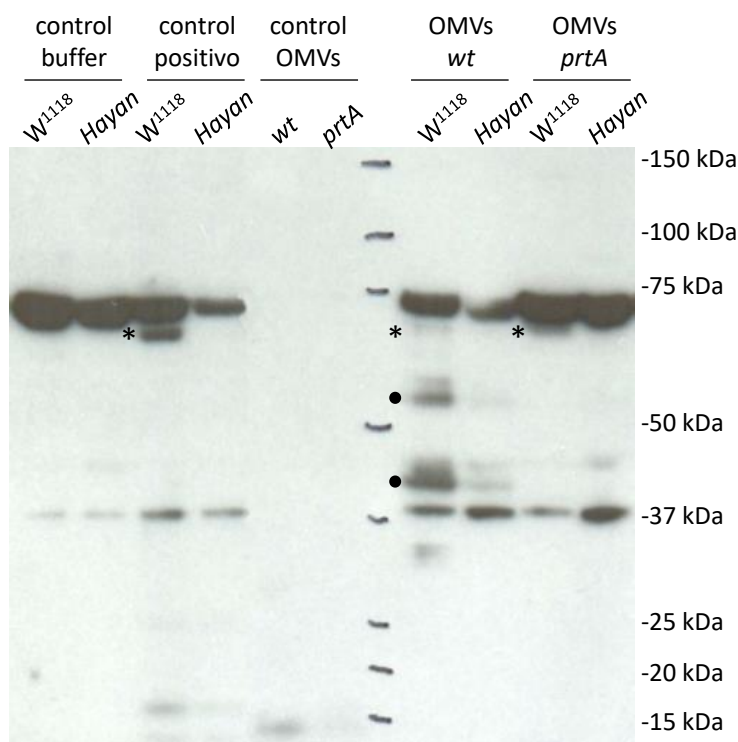


Figura IV.21. Inmunodetección de fenol oxidasa en extractos de hemolinfa en moscas microinyectadas con OMVs. Insectos adultos salvajes W¹¹¹⁸ o de la línea mutante *hayan* fueron microinyectados con 69 nL de soluciones de OMVs wt u OMVs *prtA* a una concentración de 0,15 ng/nL. Como control negativo, se utilizaron moscas inyectadas con buffer HEPES 50 mM; como control positivo, se inyectaron las moscas con una suspensión bacteriana concentrada de *Micrococcus luteus* y *Erwinia carotovora*. Luego de 3 horas del tratamiento aplicado, se aplicaron protocolos de extracción de hemolinfa, según se describe en la sección III.18.2. Se sembraron 10 µg de cada una de las muestras para el ensayo de Western blot, donde se utilizó un anticuerpo primario anti-fenoloxidasa hecho en conejo. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo conjugado a HRP. Como controles adiciones del ensayo, también se incluyeron 10 µg de preparaciones de OMVs wt o *prtA*.

Para continuar indagando en este modelo, fue necesario determinar si el desafío con vesículas en los insectos efectivamente representa un estímulo capaz de dirigir el procesamiento de pro-PO en su forma activa. Con este objeto, se microinyectaron moscas salvajes *W¹¹¹⁸* y *Hayan*, con vesículas salvajes o *prtA*. A las 3 horas p.i., se extrajeron muestras de hemolinfa y se realizaron ensayos de *Western blot* para inmunodetectar PO (figura IV.21). El experimento se realizó en colaboración con la Dra. Di Venanzio.

Se detectó una banda proteica (indicada con un asterisco) de menor intensidad a lo esperado, en comparación con el control positivo, la cual correspondería a la forma activa de la PO descrita previamente en la literatura (246). Por otro lado, sin embargo, se detectaron al menos dos formas procesadas alternativas de la PO luego del tratamiento con OMVs *wt* (indicadas mediante círculos solidos). Dichas formas resultaron indetectables en los insectos tratados con OMVs *prtA*, sugiriendo que estas especies moleculares serían generadas por el clivaje directo de la pro-PO por parte de PrtA. A partir de este hallazgo, se plantea la disyuntiva de cuál sería la fuente de síntesis de ROS. Una posibilidad es que al menos una de estas especies sea enzimáticamente activa, provocando así la desregulación de la homeostasis de ROS en la hemolinfa. En cambio, si la PO se inactiva por este procesamiento, otra posibilidad es que *Hayan* misma sea activada por un clivaje dependiente de PrtA. Luego, *Hayan* podría activar otros blancos desconocidos. Al momento de escritura del presente Trabajo de Tesis, nuestros colegas franceses se encuentran analizando la susceptibilidad frente a las vesículas de moscas carentes de fenol oxidasa, y llevando a cabo protocolos que permiten la detección de ROS, mediante el uso de reactivos fluorogénicos.

IV.6. Diseño, construcción y prueba de concepto de una cepa etiquetada en OMVs

Una caracterización más profunda de las OMVs de *Sma* en su rol patogénico requerirá la identificación y localización de las vesículas secretadas por *Sma* durante el proceso infeccioso. Por ello, nos propusimos como objetivo la construcción de una cepa de *Serratia* capaz de secretar OMVs fácilmente identificables a través de una etiqueta antigénica presentada sobre la superficie de las vesículas.

Con el objeto de mantener condiciones fisiológicas normales, y evitar potenciales problemas de sobreexpresión de proteínas, se eligió modificar mediante ingeniería genética la secuencia de ADN cromosomal correspondiente a alguna de las proteínas

normalmente transportadas en vesículas teniendo en cuenta los datos obtenidos en los experimentos de LC-MS/MS (sección IV.2). En todas las muestras de OMVs analizadas, se detectó a la proteína OmpA, la cual también formó parte del proteoma obtenido para membrana externa. OmpA se encuentra conservada en enterobacterias, donde representa el antígeno de superficie celular más abundante, con unas 1×10^5 copias por célula (340). La proteína OmpA de *E. coli* ha sido extensamente estudiada (341). Es una proteína integral de membrana embebida en la membrana externa como un barril β . Contiene cuatro bucles extracelulares expuestos (L1, L2, L3 y L4). La proteína procesada contiene 325 residuos aminoacídicos, y consiste en dos dominios, un dominio N-terminal transmembrana de 170 aminoácidos, conectado mediante una región bisagra corta a un dominio C-terminal periplásmico de 136 residuos que, como se refirió en la Introducción, se une al PG subyacente. Además funcionar como porina, permitiendo el paso de pequeño solutos de un lado a otro de la membrana, se le han atribuido una variedad de roles tales como: adhesina, invasina, blanco del sistema inmune, y receptor de bacteriófagos.

Por otra parte, OmpA se ha utilizado previamente en aplicaciones biotecnológicas como el despliegue en superficie de antígenos a través de la inserción de péptidos en sus bucles extracelulares. Para los bucles L2, L3 y L4, está demostrado que péptidos pequeños (de hasta 21 residuos) pueden ser insertados sin una reducción concomitante en los niveles de proteínas y de incorporación en membrana (342, 343).

En resumen, considerando la abundancia natural de OmpA, su ubicuidad en las vesículas de membrana externa, y los estudios previos que indicaban la factibilidad de insertar péptidos en sus bucles extracelulares, se escogió esta proteína como blanco para el etiquetado antigénico de OMVs.

En primer lugar, fue necesario determinar el grado de homología entre las OmpA de *E. coli* y de *Sma* RM66262: sus secuencias primarias se compararon a través de la herramienta BLASTP del sitio NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), obteniendo un 75% de identidad aminoacídica entre ambas. La proteína completa sin procesar de *Sma* contiene 359 aminoácidos en comparación con los 346 aminoácidos codificados por *ompA* de *E. coli*. A través del programa Psort (<https://psort.hgc.jp/>), se predijo la existencia de una secuencia señal N-terminal compuesta por los primeros 21 residuos aminoacídicos, de manera análoga a lo descrito para su homóloga en *E. coli* (344). Por ende, el PM estimado de la proteína madura de *Serratia* es de 36 kDa. Complementariamente, se efectuó un modelado por homología de la estructura tridimensional de *OmpA* de *Serratia*, utilizando el servidor SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org/interactive/tstQ73/models/>). La predicción estructural determinó que OmpA de *Sma* presenta una estructura similar a la descrita para *E. coli*, formando un barril β con cuatro bucles extracelulares (figura IV.22.A). En particular, nos interesamos en la región L3, dado que el modelo generado por computadora mostró que es el bucle que más distancia se alejaría de la superficie. Verhoeven *et al.* (343) han reportado la inserción exitosa de los epítopes 3xFLAG y 2xmyc en este bucle, específicamente luego del residuo de asparagina (N) en la posición 130. A través de la alineación de secuencias entre ambas proteínas homólogas, concluimos que dicho residuo se encuentra conservado en la proteína de *Sma* (figura IV.22.B), y por lo tanto, se eligió como el sitio blanco para la inserción antigénica. De modo interesante, de acuerdo a la predicción estructural, el bucle L3 de *Sma* sería más extenso que el descrito para *E. coli*, con cinco residuos aminoacídicos adicionales que formarían parte de dicha estructura.

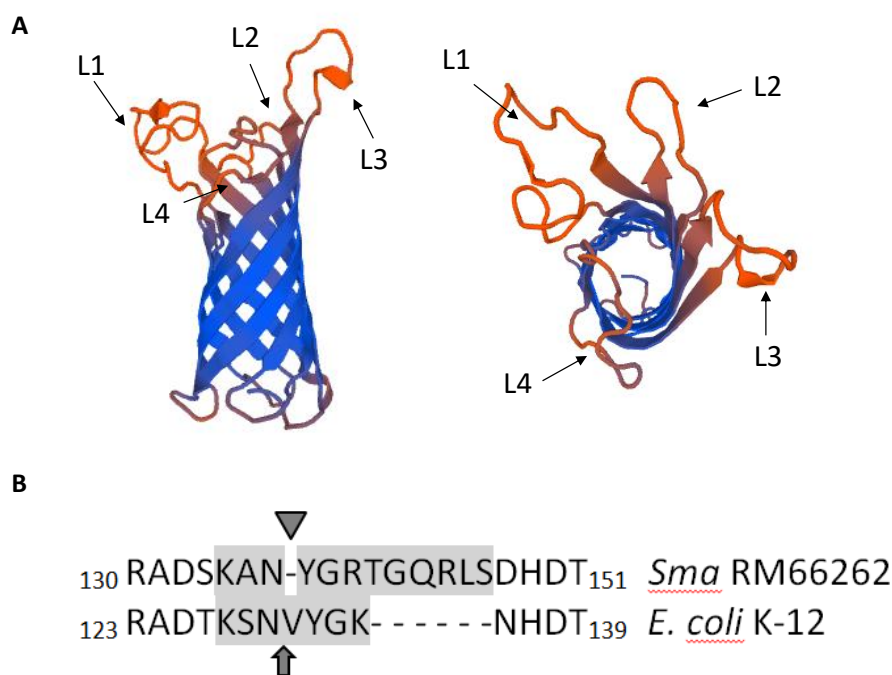


Figura IV.22. A) Modelo tridimensional de OmpA de *Sma* RM66262. El modelado por homología y las vistas tridimensionales se realizaron en el servidor SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Se muestra dos vistas: lateral (izquierda) y superior (derecha). Las flechas azules indican las láminas beta formando la estructura tipo barril; los cuatro bucles extracelulares están representados en naranja y enumerados (L1, L2, L3, L4). **B)** Alineamiento de secuencias primarias de OmpA. Los residuos que forman parte del bucle L3 están resaltados en gris. El sitio de inserción del péptido SA-1 descrito por Verhoeven *et al.* (343) se indica con una flecha; el sitio de inserción del péptido CCPGCC en OmpA de *Sma* se indica con un triángulo.

En cuanto a la elección del epítipo a insertar, decidimos utilizar la secuencia hexapeptídica CCPGCC, que contiene un motivo tetra-cisteína (4-Cys). Tsien *et al.* (345) fueron los primeros en describir que dicha secuencia se une de forma específica

a un reactivo biarsenical derivado de la fluoresceína, conocido por sus siglas como FIAsh (*fluorescein arsenical hairpin binder*). El FIAsh se utiliza como un complejo no fluorescente cuando se encuentra unido a etanoditiol (EDT), y se vuelve fluorescente al unirse al motivo tetra-cisteína, desplazando al EDT. Debido a que la secuencia CCPGCC rara vez está presente en proteínas endógenas, la incorporación de dicha secuencia a una proteína blanco permite etiquetarla específicamente. Asimismo, las proteínas etiquetadas pueden ser marcadas en células vivas, sin necesidad de aplicar protocolos previos de fijación, lo que daría la posibilidad –en nuestro caso- de localizar a las vesículas en tiempo real. Por último, el tamaño reducido de la etiqueta rara vez interfiere con la función proteica, en comparación –por ejemplo- con proteínas de fusión a GFP (346, 347).

La construcción de la cepa etiquetada *ompA::4-Cys* requirió un evento de doble recombinación a nivel cromosomal, el cual se llevó a cabo utilizando el vector suicida pKNG101. Como paso previo, se produjo un evento de simple recombinación que interrumpió el gen de *ompA*, generando la cepa mutante *ompA*, carente de dicha proteína. Los detalles se describen en Materiales y Métodos, sección III.8.3.

En primera instancia, determinamos que las cepas *ompA* y *ompA::4-Cys* crecen con la misma cinética que la cepa parental (figura IV.23.A). Posteriormente, a partir de estas mismas cepas, se purificaron las fracciones de ME; el análisis por SDS-PAGE indicó que la cepa *ompA::4-Cys* expresa y ensambla la proteína recombinante en este compartimento. Como control negativo, se incluyó la muestra perteneciente a la cepa mutante *ompA*, que facilitó la identificación de la banda correspondiente a OmpA en la cepa salvaje (figura IV.23.B). Luego, se aplicó un protocolo de tinción con FIAsh sobre un extracto de proteínas totales de la cepa *ompA::4-Cys* (Materiales y Métodos, sección III.16.1). El análisis de las proteínas fluorescentes demostró la alta especificidad del procedimiento de tinción con FIAsh, en comparación con una muestra de proteínas procesada de idéntica manera de la cepa *wt* (figura IV.23.C).

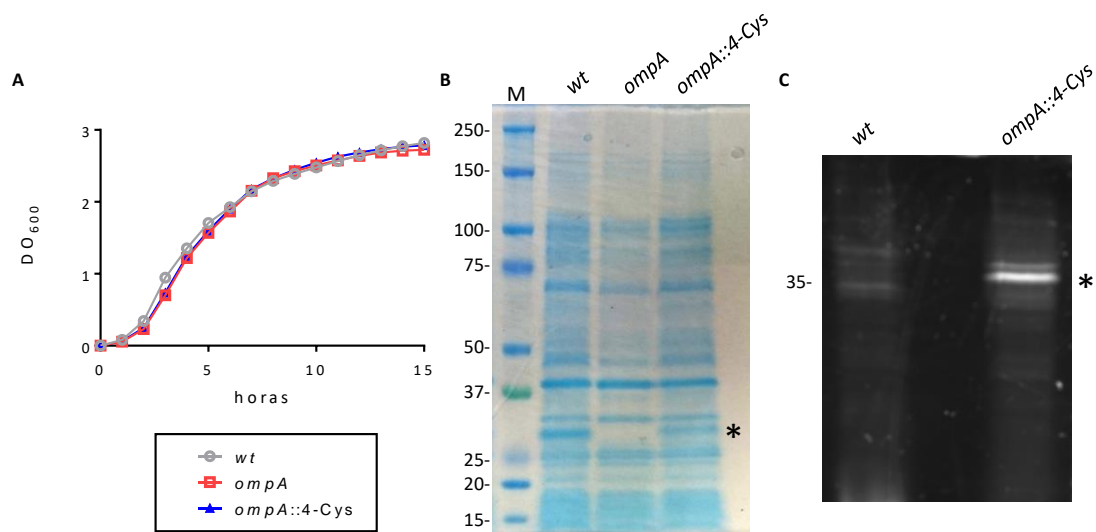


Figura IV.23. A) Curva de crecimiento de las cepas salvaje (*wt*), *ompA*, y *ompA::4-Cys*. Las bacterias se cultivaron a 30°C en microplacas durante 15 horas en volumen final de 100 μ L de medio LB. Las curvas representan el promedio de tres experimentos independientes. **B) Perfiles proteicos de proteínas de membrana externa.** Las bacterias fueron cultivadas a 30°C durante 16 horas en medio LB. Las proteínas se obtuvieron utilizando el protocolo descrito en la sección III.11.3. Se analizaron 15 μ g de cada muestra mediante SDS-PAGE y posterior tinción con Coomassie. **C) SDS-PAGE del complejo FIAsH-proteína.** Bacterias *wt* y *ompA::4-Cys* fueron cultivadas a 30°C durante 16 horas en medio LB. Se prepararon los extractos totales, y se marcaron con una mezcla FIAsH-EDT. Luego, el compuesto no unido se lavó con PBS. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE. El complejo fluorescente OmpA-4-Cys-FIAsH fue visualizado en un transiluminador UV.

Posteriormente, células bacterianas de las cepas *wt* y *ompA::4-Cys* fueron cosechadas, teñidas con FlAsH, lavadas, e inmovilizadas sobre *pads* de agarosa. La visualización mediante microscopía de fluorescencia corroboró la expresión de la proteína recombinante sobre la envoltura bacteriana, la cual se pudo detectar específicamente y con baja señal de fondo en el control negativo (figura IV.24).

A continuación, se prepararon OMVs a partir de la cepa *ompA::4-Cys*, y la cepa *wt* como control. Las vesículas fueron teñidas con FIAsH-EDT y posteriormente lavadas usando un sistema de ultrafiltración. A partir de las imágenes de microscopía de fluorescencia (figura IV.25.A), podemos concluir que la proteína recombinante OmpA::4-Cys se secreta correctamente en vesículas.

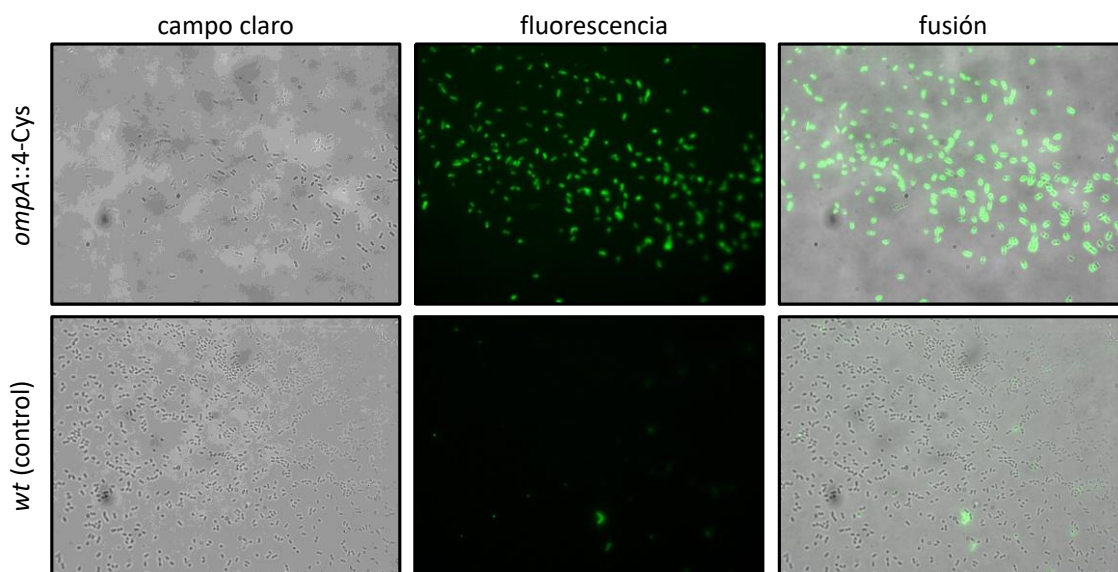


Figura IV.24. Micrografías de células bacterianas expresando OmpA::4-Cys. Bacterias de las cepas indicadas fueron crecidas en LB a 30°C durante 16 horas. Posteriormente, las células se cosecharon, se marcaron con FIAsH-TCEP, se inmovilizaron en *pads* de agarosa, y se visualizaron mediante microscopia de fluorescencia (Materiales y Métodos, sección, III.16.2).

El último control realizado fue determinar que la inserción de la secuencia CCPGCC no afecte los niveles de vesiculización en la cepa etiquetada. Como referimos anteriormente, OmpA es un componente importante de la membrana externa, involucrado en el anclaje de la ME al PG subyacente, y por ende, cualquier perturbación estructural inducida en la proteína etiquetada podría provocar niveles alterados en la secreción de vesículas. Por ello, se cuantificaron comparativamente las OMVs secretadas por la cepas *wt* y *ompA::4-Cys* luego de 16 horas de crecimiento a 30°C en LB. La cuantificación se realizó en base al contenido lipídico utilizando el fluoróforo FM4-64 (Materiales y Métodos, sección III.14.2). Los resultados indicaron que los niveles de OMVs producidas por la cepa *ompA::4-Cys* no difieren de los cuantificados para la cepa *wt*. De manera interesante, se incluyó también en dicho análisis a la cepa mutante *ompA*, la cual secretó en promedio 5,7 veces más OMVs que la cepa salvaje (figura IV.25.B). Este fenotipo se correlaciona con los reportados previamente para *E. coli* (111), *Salmonella* (112), y *A. baumannii* (113), donde cepas carentes de OmpA presentan un fenotipo hipervesiculizante, probablemente como consecuencia de un entrecruzamiento deficiente entre el PG y la membrana externa. Por lo tanto, este resultado indicaría mecanismos de biogénesis de vesículas comunes a todos estos géneros.

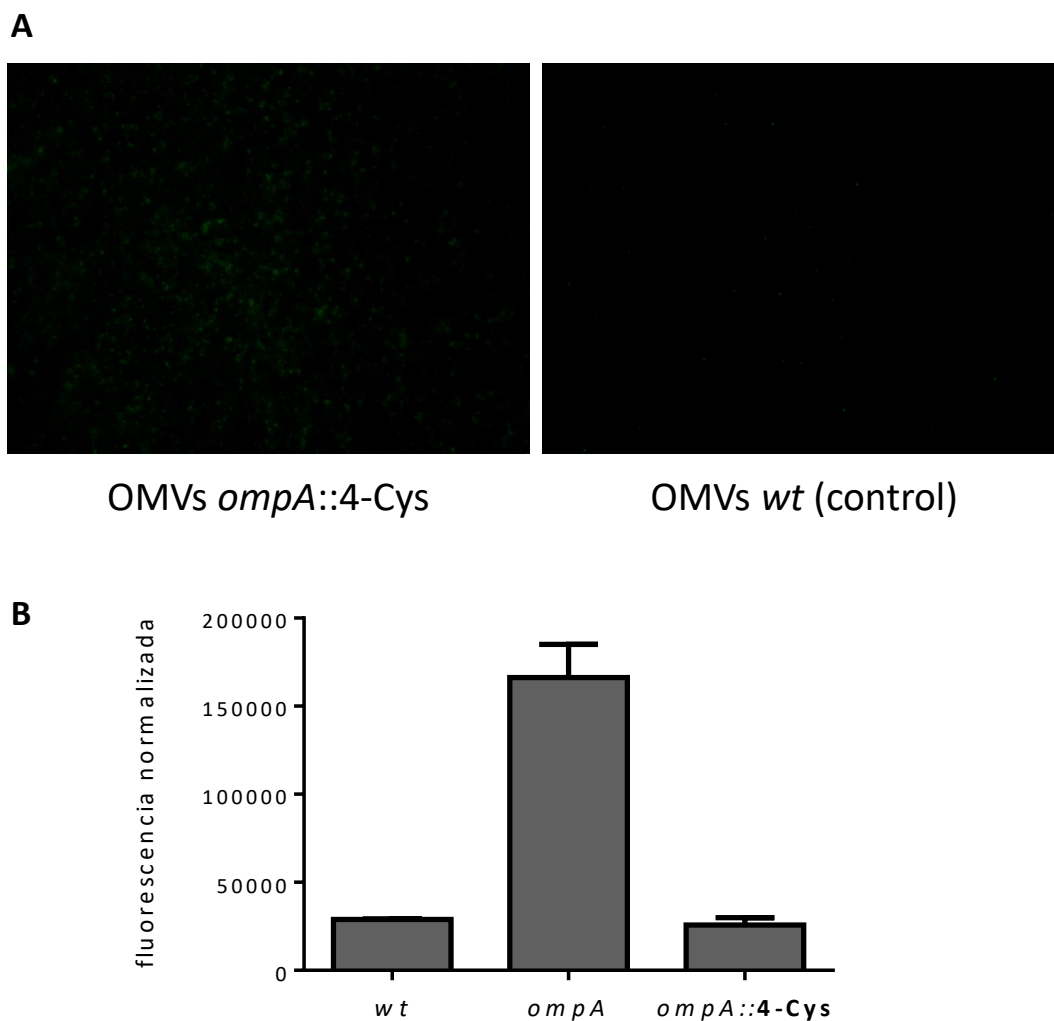


Figura IV.25. A) Micrografías de fluorescencia de OMVs. Bacterias de las cepas indicadas fueron crecidas en LB a 30°C durante 16 horas. Posteriormente, se purificaron y marcaron las vesículas mediante el protocolo descrito en la sección III.16.3. La visualización de las OMVs se efectuó mediante microscopía de fluorescencia. **B) Cuantificación de OMVs.** Se cultivaron bacterias de las cepas indicadas a 30°C durante 16 horas. Luego, se cuantificó el contenido vesicular utilizando el fluoróforo FM4-64 (Materiales y Métodos, III.14.2).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este capítulo permiten formular las siguientes conclusiones:

- Se logró la puesta a punto de una metodología optimizada para la purificación de OMVs de *Sma* capaz de separar el contenido vesicular de componentes contaminantes, en particular, flagelina.
- El examen de OMVs y de ME a través de LC-MS/MS reveló la existencia de componentes comunes y no comunes entre ambas fracciones, indicando la probable existencia de mecanismos de selección/exclusión de proteínas durante la vesiculización. Asimismo, se detectaron un número de factores de virulencia asociados a las vesículas, sugiriendo un rol de las OMVs como vehículo de transporte de estos factores durante el proceso patogénico.
- A través del análisis por TEM, se determinó la integridad y el tamaño promedio de las OMVs purificadas *in vitro*.
- Mediante análisis de co-incubación de OMVs salvajes o de OMVs carentes de la serralisina PrtA con células CHO, se demostró que las vesículas son citotóxicas frente a esta línea celular, principalmente de manera dependiente de PrtA.
- Utilizando OMVs producidas por la cepa salvaje y marcadas con un fluoróforo, se determinó que –tras su co-incubación con células CHO- las vesículas son capaces de localizar dentro de las células eucariotas, lo que sugiere que portan determinantes que inducen su internalización. Las vesículas se detectaron de modo preferente en el espacio perinuclear.
- Ensayos de microinyección de OMVs en *Drosophila melanogaster* demostraron la toxicidad de las vesículas a altas concentraciones. La serralisina PrtA fue el factor mayormente responsable de dicho fenotipo.
- En *D. melanogaster*, las OMVs son capaces de inducir las vías de señalización de la respuesta inmune sistémica Imd y Toll. La integridad de ambas vías provee protección frente a la administración sistémica de vesículas, lo que señalaría la existencia de genes co-regulados por ambas vías que serían necesarios para montar una adecuada respuesta defensiva ante las OMVs.

- En paralelo, la co-administración de OMVs con el compuesto antioxidante NAC logró rescatar parcialmente la muerte de *D. melanogaster*, señalando de modo indirecto una alteración de la homeostasis sistémica de ROS en el insecto. Asimismo, se observó una menor susceptibilidad frente a las OMVs en moscas mutantes *Hayan* y en insectos con la vía JNK silenciada. Todas estas evidencias indicarían que las OMVs disparan el mecanismo normalmente protector denominado “respuesta sistémica a la herida redox dependiente” y lo convierten en un proceso detrimental, probablemente como consecuencia de una generación desmedida de ROS. Ensayos por *Western blot* sugieren que el clivaje y activación no canónica de la PO por parte de PrtA podría ser la fuente de estas especies moleculares.
- Se diseñó y construyó una cepa de *Serratia* con un epítipo insertado la proteína OmpA. El análisis de la cepa *ompA::4-Cys* demostró que la proteína recombinante no altera los niveles de vesiculización en comparación con la cepa salvaje. Mediante ensayos de tinción con FIAsh y microscopía de fluorescencia se logró detectar específicamente OmpA::4-Cys en OMVs purificadas. Esta cepa constituye una valiosa herramienta que permitirá a futuro la localización de vesículas durante el curso infectivo de *Sma* en el hospedador.

CAPÍTULO II

“Expresión y regulación de proteasas secretadas en *Serratia marcescens*”

V. Expresión y regulación de proteasas secretadas en *Serratia marcescens*

Introducción

Los resultados obtenidos en el anterior capítulo del presente Trabajo de Tesis señalaron que la serralisina PrtA es el factor de virulencia predominante transportado por las OMVs de *Sma* purificadas *in vitro*, siendo el componente principal de la toxicidad observada al co-incubar vesículas con células epiteliales, o administrarlas a nivel sistémico en *D. melanogaster*.

Asimismo, como se refirió en la Introducción, estudios *in vitro* indicaron que PrtA resultó citotóxica frente a una variedad de tipos celulares (74–76), y fue capaz de degradar factores inmunes humorales de mamífero y de insectos (74, 348). En otros reportes, PrtA contribuyó al daño tisular durante la queratitis infecciosa causada por *Sma* (78), alteró las respuestas celulares del sistema inmune en el modelo de *Bombyx mori* (81, 82), y promovió infecciones secundarias por un virus respiratorio en un modelo de ratón (349).

Sin embargo, a pesar del gran número de estudios atendiendo las propiedades virulentas y patogénicas de esta metaloproteasa de *Sma*, los mecanismos regulatorios que gobiernan su expresión están poco caracterizados. Entre los reguladores descritos, se encuentra CRP, la proteína receptora de AMP cíclico. Una mutación en *crp* provoca un incremento en la producción de serralisina PrtA, y una pérdida de las actividades lipasa y quitinasa secretadas (350). Por otro lado, Matsuyama *et al.* (351) observaron una reducción de la actividad proteasa cuando el gen *hexS*, un factor transcripcional de la familia LysR y homólogo a *rhIA* de *E. coli*, es expresado en *trans*, sugiriendo un rol regulatorio para esta proteína. Una serie de reportes más recientes contribuyó significativamente en la comprensión de los mecanismos de regulación de PrtA. En primer término, se reportó que el sistema de dos componentes EepRS modula positivamente la transcripción de *prtA*, aportando así el primer ejemplo de regulación transcripcional positiva sobre dicho gen (352). Asimismo, se determinó que EepR se encuentra bajo control transcripcional directo y negativo por AMPc-CRP (353). Se especuló que en condiciones ricas de nutrientes -donde los niveles de AMPc se reducen- los niveles de EepR se incrementarían e inducirían una mayor expresión de PrtA, la cual en conjunción con otras enzimas hidrolíticas facilita la degradación de macromoléculas presentes en el medio extracelular en sus componentes constituyentes, los cuales son luego captados por los sistemas de transporte de la bacteria (352). En un último reporte, estos mismos autores profundizaron las

observaciones hechas por Matsuyama *et al.* (351) sobre el rol regulatorio de HexS. En base a las evidencias experimentales obtenidas, postularon un modelo donde HexS y EepR se regulan recíprocamente de manera negativa, y a la vez, ambas controlan de manera directa (e inversa) la transcripción de PrtA. Sin embargo, las señales que estimulan a estos dos reguladores son desconocidas (354).

Por otra parte, los estudios que se han ocupado de las propiedades patogénicas de PrtA, generalmente han obviado la posibilidad de que otras metaloproteasas sean simultáneamente co-expresadas por el aislamiento particular en estudio de *Sma*. De hecho, Matsumoto *et al.* (355) demostraron, mediante técnicas bioquímicas, que *Sma* kums 3958 produce dos metaloproteasas de 56 y 60 kDa, así como también una cisteína proteasa de 73 kDa. Más recientemente, analizando los datos genómicos la cepa de *Sma* Db11, cepa derivada de *Sma* Db10, que fue originalmente aislada a partir de una mosca moribunda (275), se identificaron *in silico* tres metaloproteasas adicionales con alta homología a la serralisina PrtA. Su expresión se corroboró tanto en *Sma* Db11 como en un aislamiento clínico asociado a queratitis -*Sma* K904- (76). Estas metaloproteasas homólogas se denominaron SlpB, SlpC, y SlpD (*Serralsin-like proteins*).

V.1. Identificación *in silico* de genes codificantes para metaloproteasas en el aislamiento *Sma* RM66262

Durante el transcurso de este Trabajo de Tesis, se llevó a cabo la secuenciación genómica de nuestro aislamiento clínico en estudio *Sma* RM662622 (274). A partir de la nueva información disponible, y teniendo en cuenta las evidencias referidas anteriormente sobre la multiplicidad de metaloproteasas, se abordó la búsqueda *in silico* de marcos abiertos de lectura que codifiquen para esta familia de enzimas en dicho aislamiento. Se efectuó un análisis genómico comparativo frente a la cepa *Sma* Db11, a partir de la cual se habían identificado los genes *slpB*, *slpC* y *slpD* (76).

Mediante la herramienta BLASTN del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), y utilizando las secuencias nucleotídicas para *prtA*, *slpC* y *slpD* correspondientes a *Sma* Db11, se detectaron sendos genes en *Sma* RM66262, obteniendo un 99% de identidad aminoacídica para *prtA* y *slpD* entre ambas cepas, y un 93% para *slpC*. Observamos que *prtA* codifica 54 pb corriente arriba de *prtI*, lo que permite pensar que forman parte de un mismo operón. El entorno genético de *prtA* es idéntico entre ambas cepas en estudio (figura V.1.A). En el caso de *slpC*, no detectamos un gen proximal

codificando para un inhibidor putativo. En lo que respecta a la sintenia en torno al mismo, se detecta el mismo arreglo génico aguas arriba; pero aguas abajo, la cepa *Sma* RM66262 codifica dos genes adicionales, ausentes en *Sma* Db11 (figura V.1.C). En cuanto al gen *slpD*, el arreglo génico en torno al mismo es idéntico entre ambas cepas. De modo interesante, observamos que el inhibidor putativo asociado a *slpD* codifica en dirección transcripcional opuesta (figura V.1.D).

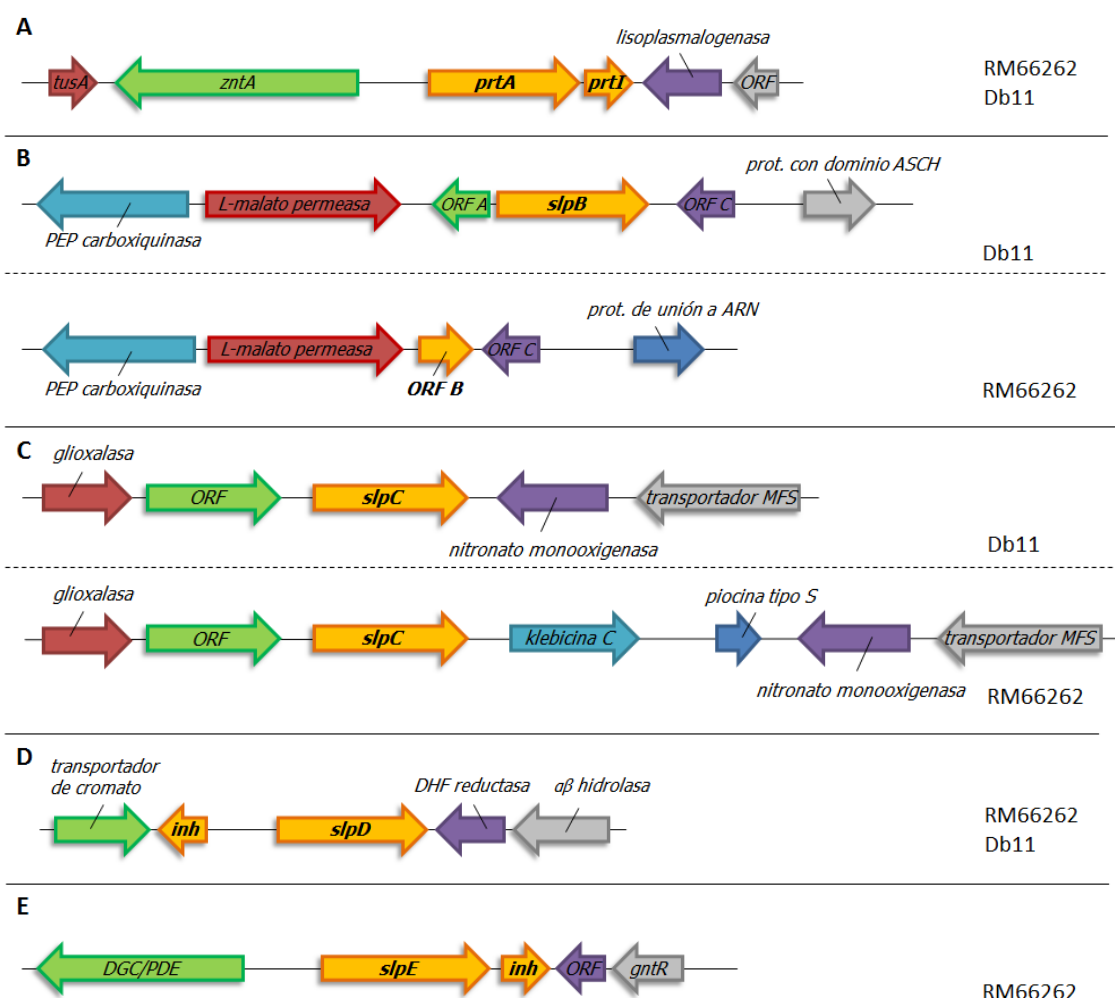


Figura V.1. Representación esquemática comparativa de loci genómicos con genes codificantes de metaloproteasas entre las cepas RM66262 y Db11. Las flechas representan las regiones codificantes y la dirección transcripcional de los genes depositados bajo los números de acceso de GenBank: *S. marcescens* RM66262 (NZ_JWLO01000001:NZ_JWLO01000019), *S. marcescens* Db11 (NZ_HG326223.1).

En cuanto al gen *slpB*, la búsqueda *in silico* a través de BLASTN en el genoma de *Sma* RM66262 arrojó como resultado un pequeño marco abierto de lectura de 276 pb (indicado como "ORF B" en la figura V.1.B) con homología a la porción central de *slpB*, y localizado en un mismo entorno génico respecto al de *Sma* Db11. Al efectuar un alineamiento (a través del algoritmo Clustal W) entre las secuencias aminoacídicas predichas para ambas proteínas, se deduce que el ORF B en *Sma* RM66262 presenta

deleciones en las regiones 5' y 3' del gen *slpB*, dando lugar a una secuencia codificante reducida cuyo producto estimado sería una proteína de 91 aminoácidos (10,2 kDa). De manera complementaria, decidimos efectuar una segunda búsqueda utilizando en este caso la secuencia aminoacídica de SlpB_{Db11} como referencia y la herramienta BLASTP de la base de datos RAST, donde se encuentra depositada la información genómica de *Sma* RM66262 (<http://rast.nmpdr.org/seedviewer.cgi?page=Organism&organism=615.36>). Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

Gen (peg #) ^a	Score	E-value
<i>prtA</i> (peg.3200)	501	e ⁻¹⁷⁶
<i>metaloproteasa alcalina secretada</i> (peg.1352)	451	e ⁻¹⁵⁷
<i>slpC</i> (peg.2138)	395	e ⁻¹³⁵
<i>slpD</i> (peg.1306)	354	e ⁻¹¹⁸

Tabla V.I. Resultados de la búsqueda por BLASTP utilizando como referencia SlpB de *Sma* Db11.
^a número del marco abierto de lectura asignado por la base de datos RAST.

De manera previsible, entre los *hits* más destacados encontramos a *prtA*, *slpC* y *slpD*. Sin embargo, el segundo resultado con mayor homología (56% de identidad aminoacídica) correspondió a un gen anotado en el RAST como “metaloproteasa alcalina secretada”; mientras que en el NCBI GenBank dicho marco abierto de lectura se encuentra anotado como “serina 3-deshidrogenasa”. Con el objeto de determinar si efectivamente dicho gen codifica para una metaloproteasa de la familia de las serralisinas, evaluamos la presencia de las características distintivas de esta familia de enzimas (64): se detectó la presencia del motivo canónico de unión a zinc en su dominio N-terminal, y también se identificaron cuatro repeticiones ricas en glicina en su dominio C-terminal, confirmando así su pertenencia a dicha familia. Continuando con el criterio aplicado previamente en la nomenclatura de metaloproteasas de *Sma*, se nombró dicho gen como *slpE*.

La tabla V.II indica, para cada una de las metaloproteasas analizadas, el grado de identidad con PrtA, la secuencia de unión a zinc, y el número de secuencias con motivo RTX. De manera llamativa, las proteasas PrtA, SlpB y SlpE poseen cuatro motivos GGXGXG; mientras que el resto (SlpC y SlpD) poseen sólo dos. Desconocemos el significado biológico de esta variación estructural.

Gen	% de identidad AA con PrtA _{RM66262}	Masa predicha de la proenzima (kDa)	HEXXHXUGUXH Secuencia del motivo de unión a zinc	GGXGXD n° secuencias motivo RTX
<i>prtA</i> _{RM66262}	100	54,0	HEIGHALGLSH	4
<i>prtA</i> _{Db11}	99	54,0	HEIGHALGLSH	4
<i>slpE</i> _{RM66262}	63	52,0	HEVGHTLGLDH	4
<i>slpB</i> _{Db11}	61	50,5	HEIGHALGLQH	4
<i>slpC</i> _{RM66262}	52	49,4	HEIGHALGLSH	2
<i>slpC</i> _{Db11}	52	49,4	HEIGHALGLSH	2
<i>slpD</i> _{RM66262}	49	57,7	HELGHALGLAH	2
<i>slpD</i> _{Db11}	49	57,7	HELGHALGLAH	2

Tabla V.II. Metaloproteasas homólogas en *Sma* RM66262 y Db11. U= Aminoácido hidrofóbico ramificado; X = aminoácido arbitrario.

V.2. Expresión nativa de *prtA*, *slpB*, *slpC* y *slpE*

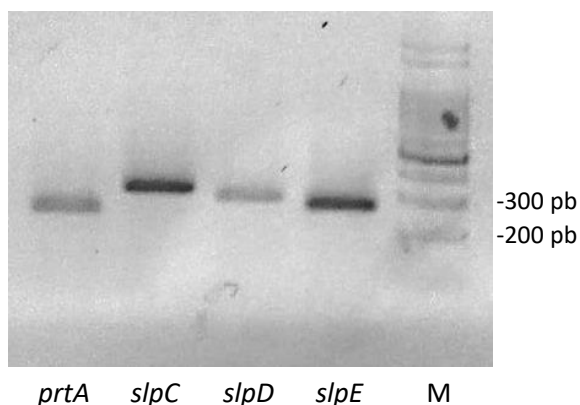


Figura V.2. Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes codificantes para metaloproteasas en *Sma* RM66262. EL ARN fue recolectado de células a una DO₆₀₀ = 3, purificado, y se verificó la ausencia de ADN cromosomal contaminante. El transcripto del gen ribosomal 16S fue utilizado como control positivo para el ADN copia. A la derecha (M), se muestran las bandas correspondientes al marcador de peso molecular.

Los resultados expuestos en el apartado anterior indicaron la existencia de cuatro genes -*prtA*, *slpC*, *slpD* y *slpE*- codificantes para metaloproteasas en nuestro aislamiento de estudio *Sma* RM66262. Para examinar si todos ellos son expresados a nivel transcripcional, se decidió efectuar ensayos de RT-PCR. Teniendo en cuenta reportes previos que señalaban que la actividad proteasa es mayormente detectada durante la fase estacionaria de crecimiento (75, 76, 352), cultivamos bacterias de la cepa salvaje en medio LB con agitación a una temperatura de 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ equivalente a 3 y recolectamos ARN. Una vez purificado y verificada la ausencia de ADN genómico contaminante, se obtuvo el ADN copia mediante un protocolo de retrotranscripción, según se describe en la sección III.3.6 de Materiales y Métodos. Finalmente, utilizando el ADN copia como molde y cuatro pares de

cebadores específicos para cada uno de los genes bajo estudio (Tabla III.3), se obtuvieron por PCR los amplicones correspondientes (figura V.2). Como se observa, los genes *prtA*, *slpC*, *slpD* y *slpE* son expresados en la condición de crecimiento ensayada. Con anterioridad a la obtención de estos resultados, PrtA y SlpC habían sido detectadas por experimentos de LC-MS/MS en muestras de OMVs purificadas *in vitro* (sección IV.2).

Se desconoce cuál sería el fundamento fisiológico de la expresión conjunta de todas estas metaloproteasas durante la fase estacionaria de cultivo, y si existe entre ellas especificidades de sustrato o propiedades fisicoquímicas diferentes. Especulamos que este conjunto de serralisinas proveen, por un lado, una ventaja adaptativa a *Sma* en la conversión de macromoléculas del medio extracelular en componentes factibles de ser incorporados por los sistemas de transporte a las bacterias; y por el otro lado, podrían contribuir a la virulencia de *Sma*, promoviendo su capacidad de colonizar y diseminarse ante la aparición de un nicho intra-hospedador.

V.3. La serralisina PrtA es la proteasa de mayor expresión y es secretada a través del sistema LipBCD

Para continuar con el estudio de expresión de las metaloproteasas, se evaluó la actividad proteolítica secretada por la cepa *Sma* RM66262. Esta actividad puede evaluarse de manera cualitativa (o semi-cuantitativa) en medio sólido mediante el uso de placas de LB-agar suplementadas con leche descremada al 2%, donde la acción de las proteasas se manifiesta como un halo degradativo irradiado a partir de la colonia bacteriana. Complementariamente, se cuantificó la actividad proteolítica en medio líquido en el sobrenadante de cultivo bacteriano, el cual se co-incuba con azocaseína como sustrato, para dar lugar a azo-aminoácidos libres, cuya concentración se determina colorimétricamente (detallado en Materiales y Métodos, sección III.9.2).

La figura V.3.A muestra el halo degradativo irradiando a partir de la cepa *wt*, indicando la existencia de al menos una proteasa secretada y activa en las condiciones ensayadas. Por otra parte, decidimos evaluar la actividad proteasa en una cepa mutante en *lipB*, gen que codifica para el transportador ABC del aparato de secreción Lip, responsable de la translocación de PrtA (306). El halo de degradación en esta mutante resultó indetectable, mientras que se registró una disminución de aproximadamente el 85% en la actividad proteasa a partir de sobrenadantes de cultivos líquidos, en comparación con la cepa *wt* (figura V.3.B). Estos resultados indican que la(s) proteasa(s) de mayor expresión dependería de la integridad del

sistema LipBCD para su activación/secreción, bajo las condiciones de crecimiento ensayadas.

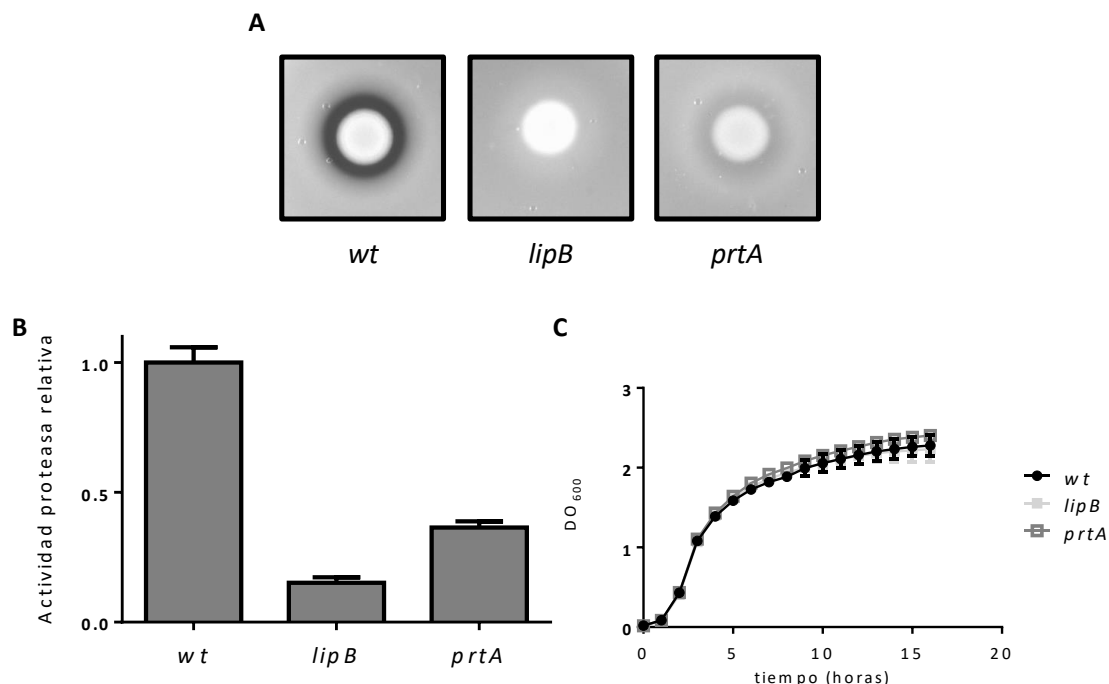


Figura V.3. Evaluación de la actividad proteolítica secretada de *Sma* salvaje (*wt*) en comparación con mutantes *lipB* y *prtA*. **A)** Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche. **B)** Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt*. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 16 horas. **C)** Curva de crecimiento de las cepas *wt*, *lipB* y *prtA* en medio LB a 37°C.

Posteriormente, se analizó si la serralisina PrtA es la proteasa secretada de mayor expresión en nuestro aislamiento. Como se observa en la figura V.3, el halo de degradación correspondiente a la cepa *prtA* es significativamente menor respecto de la cepa salvaje, mientras que la actividad en sobrenadante de cultivo mostró una reducción del 60% respecto de la cepa salvaje. Dicho fenotipo fue restaurado al expresar en *trans* a *prtA* desde el plásmido pBB2::*prtA* (figura V.4). Estos resultados señalan que, de modo análogo a lo reportado para otras cepas de *Sma* (75, 76), PrtA es la proteasa secretada de mayor nivel de expresión en *Sma* RM66262.

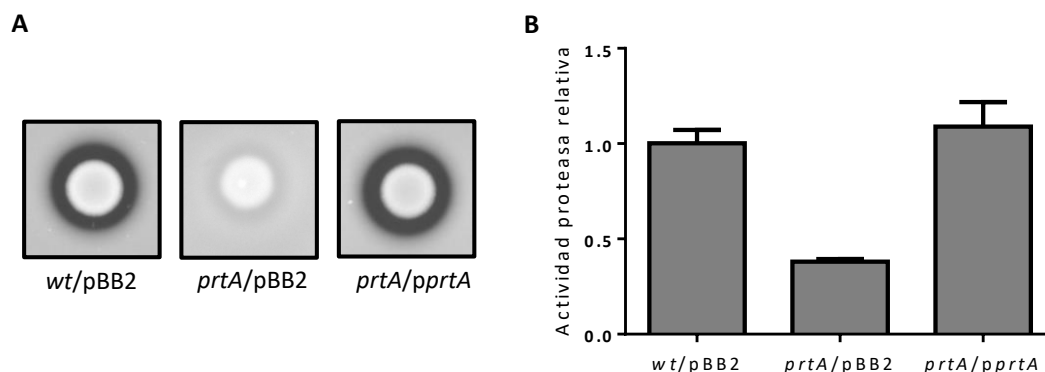


Figura V.4. Evaluación de la actividad proteolítica en la cepa mutante *prtA* complementada en trans. A) Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche. B) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa salvaje con el vector vacío (*wt/pBB2*). Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, se suplementó el medio de cultivo con kanamicina 50 µg/ml e IPTG 200 µM. Las bacterias se cultivaron a 37°C durante 16 horas.

Es interesante señalar que los fenotipos presentados por las cepas *lipB* y *prtA* no fueron idénticos: se observó un pequeño halo degradativo residual para *prtA* en placas LB-agar-leche, el cual fue indetectable en *lipB*. Además, los niveles de actividad proteasa medidos por hidrólisis de azocaseína resultaron 2,4 veces superiores en un entorno *prtA* respecto de uno *lipB*. Como control, se determinó que las tres cepas ensayadas crecen a un ritmo similar (figura V.3.C). Los resultados sugieren la existencia de al menos una proteasa adicional dependiente del sistema LipBCD para su secreción, la cual contribuiría de manera minoritaria a la actividad proteasa total detectada, en las condiciones experimentales utilizadas.

V.4. La modificación del extremo C-terminal de PrtA altera su secreción

En base a los resultados obtenidos en el capítulo anterior, y con el objeto de generar herramientas que contribuyan al estudio de PrtA como parte de la carga vesicular, así como también al análisis de su expresión en distintas condiciones de cultivo y/o en distintos entornos genéticos, nos abocamos a la construcción de una cepa mutante que expresara PrtA fusionada a un epítipo capaz de ser inmunodetectado mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.

Reportes previos indican que la serralisina sufre un procesamiento post-traduccion, previo a su secreción, en su extremo N-terminal, dando lugar a una proteína madura de 50,6 kDa (69). Por lo tanto, se añadió la etiqueta en el extremo C-terminal de la proteína. En primer término, se construyó una fusión cromosomal añadiendo en fase la secuencia que codifica para 3xFLAG (*prtA-3xFLAG*), según se describe en Materiales y Métodos, sección III.8.2. Esta etiqueta posee la secuencia peptídica DYKDHDG-DYKDHDY-DYKDDDDK, con un peso molecular de 2,73 kDa, y

un pl teórico igual a 4,16. Posteriormente, se analizaron los niveles de actividad proteolítica secretada de la cepa *prtA*-3xFLAG, tanto en medio sólido como en medio líquido. Se observó que dicha actividad disminuyó severamente en relación a la cepa *wt*, y fue similar a la observada para la cepa *prtA* (figura V.5).

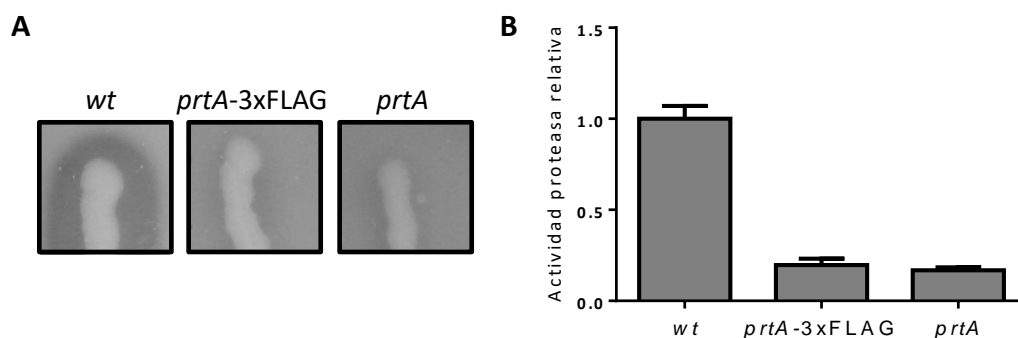


Figura V.5. Evaluación de la actividad proteolítica de la cepa etiquetada *prtA*-3xFLAG. A) Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche. B) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt*. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas a 30°C durante 16 horas.

Ante este resultado, nos planteamos dos hipótesis: la proteína *PrmA*-3xFLAG es secretada normalmente pero la etiqueta impide su normal actividad enzimática; o bien, la cepa etiquetada posee niveles alterados de secreción para la serralisina recombinante. Para discernir entre estas posibilidades, se cultivaron las cepas salvaje y *prtA*-3xFLAG, se prepararon muestras proteicas correspondientes a las fracciones extracelulares (SN) y a los extractos totales (ET), y se efectuó la inmunodetección de la etiqueta FLAG y un análisis global del perfil proteico.

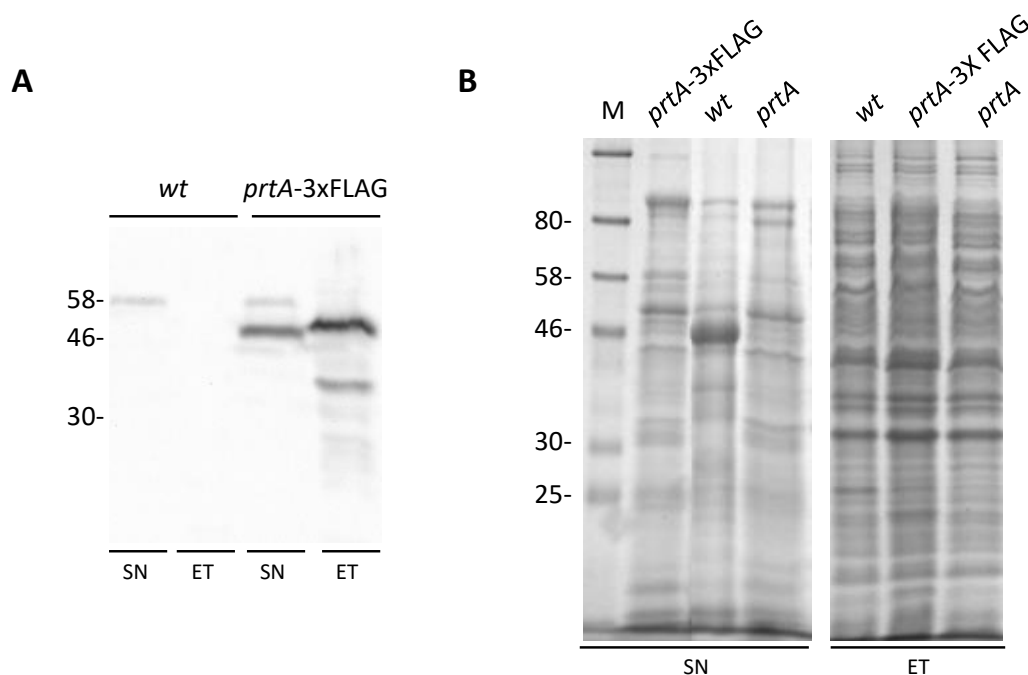


Figura V.6. A) Análisis de la expresión de la proteína de fusión PrtA-3xFLAG por Western blot. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-FLAG como primario, y luego se utilizó anti-ratón-HRP como anticuerpo secundario. **B) Perfiles proteicos de las cepas wt, prtA-3xFLAG y prtA.** Las bacterias fueron cultivadas a 30°C durante 16 horas. Las células se cosecharon por centrifugación, y se resuspendieron en solución de siembra desnaturalizante, obteniendo los extractos proteicos totales (ET). Los extractos extracelulares (SN) fueron obtenidos a partir de los sobrenadantes de cultivo, previamente concentrados por TCA (Materiales y Métodos, secciones III.11.1 y III.11.2). Las cantidades sembradas son equivalentes a 0,05 unidades de DO₆₀₀ para los ET, y 3 unidades de DO₆₀₀ para los SN. A la izquierda de cada figura se indican las bandas correspondientes al marcador de peso molecular (en kDa).

Como se muestra en la figura V.6.A, se detectó la presencia de una banda específica de alrededor de 50 kDa en el extracto extracelular (SN) de la cepa etiquetada *prtA-3xFLAG* que correspondería a la proteína de fusión. Por otro lado, en el extracto total de dicha cepa observamos una banda principal cuyo peso molecular es ligeramente mayor al de PrtA-3xFLAG secretado, la cual correspondería a la forma no procesada de la proteína. Asimismo, por debajo de esta banda, se detectó una serie de bandas adicionales que no se observaron en la muestra control perteneciente a la cepa salvaje, probablemente consecuencia de la degradación PrtA-3xFLAG acumulada intracelularmente. En la parte B de la figura, se analizaron los perfiles de expresión proteica por tinción por Coomassie tanto en sobrenadantes como en extractos totales: observamos que en la cepa salvaje, la serralisina PrtA migra como una banda mayoritaria a la altura de 50 kDa, que desaparece en la cepa control *prtA*. El perfil proteico de la cepa etiquetada *prtA-3xFLAG* es similar al de la cepa *prtA*. Entonces, a pesar de poder inmunodetectar serralisina etiquetada en la fracción extracelular, dicha señal no fue detectable por tinción con Coomassie, indicando la

ausencia de PrtA-3xFLAG en una cantidad suficiente como para contribuir significativamente a la actividad proteolítica secretada.

El evento de recombinación simple mediado por el pKNOCK::*prtA*-3xFLAG al generar la construcción de la cepa etiquetada podría tener un efecto polar sobre el gen *prtI*, codificado corriente abajo de *prtA*, si ambos genes formaran parte de la misma unidad transcripcional. Para descartar la posibilidad de que la falta de expresión de *prtI* sea la causa de los niveles aberrantes de secreción en la cepa *prtA*-3xFLAG, se complementó dicha cepa mediante la expresión en *trans* de *prtI* a partir del plásmido pBB2::*prtI*. Sin embargo, tanto los perfiles proteicos de los extractos extracelulares como los niveles de actividad proteolítica secretada fueron similares entre las cepas *prtA*-3xFLAG/pBB2::*prtI* y la cepa control *prtA*-3xFLAG/pBB2 (no mostrado), descartando así la hipótesis planteada.

En suma, estos resultados sugieren que la fusión del epítipo 3xFLAG al C-terminal de PrtA disminuye significativamente sus niveles de secreción dependientes del transportador LipBCD. Es probable que esto se deba a la alteración generada en su extremo C-terminal, el cual ha sido señalado como determinante para el reconocimiento y exporte mediados por el sistema Lip (356). Específicamente, los determinantes estructurales que han sido determinados como necesarios para la secreción mediada por los SSTI son: un número variable de motivos RTX (descritos anteriormente); un motivo de cinco residuos aminoacídicos con la secuencia consenso V/I-X-V/I/L-V/I/T/M-G (X: cualquier aminoácido); y un motivo en el extremo C-terminal compuesto por un residuo de D/E seguido de 3-5 residuos hidrofóbicos. Así, el agregado de aminoácidos adicionales al extremo C-terminal de PrtA podría dificultar el reconocimiento y la secreción mediados por el transportador Lip.

Como alternativa, decidimos construir una segunda cepa etiquetada en *prtA*, a través de la fusión del epítipo 6xHis al C-terminal de la proteína, con una metodología similar a la utilizada previamente (Materiales y Métodos, sección III.8.2). Hipotetizamos que el menor tamaño de esta etiqueta (6 residuos aminoacídicos; 840 Da) en comparación con el 3xFLAG (22 residuos aminoacídicos) disminuiría la probabilidad de provocar alteraciones en la secreción de la enzima.

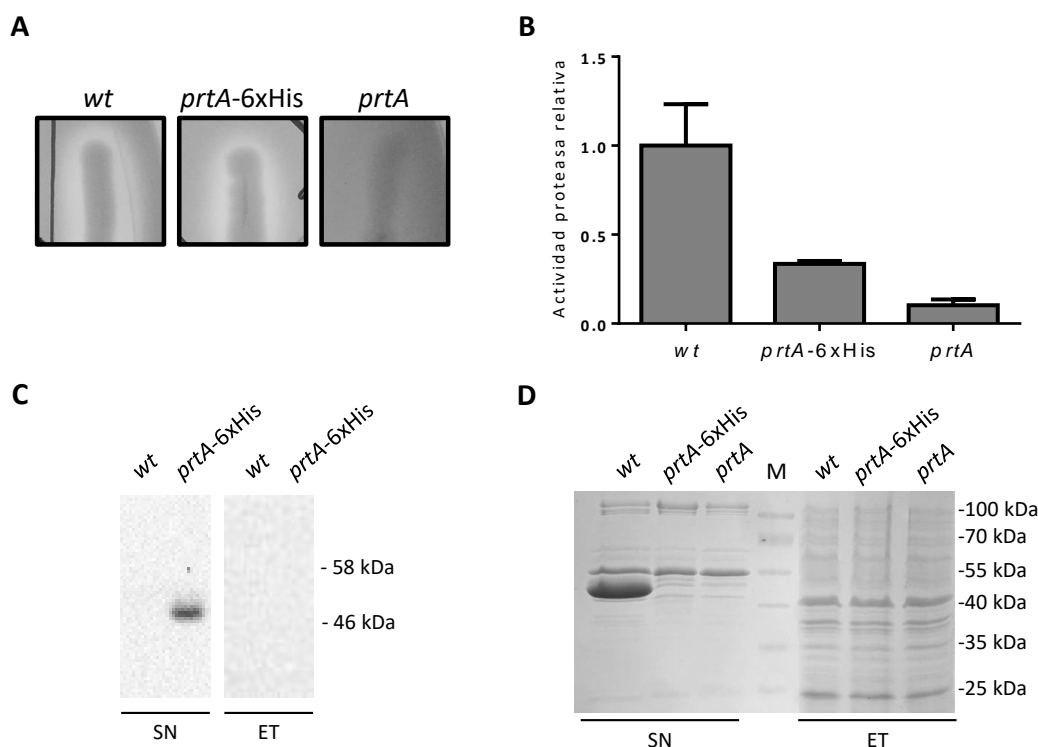


Figura V.7. Análisis de actividad proteolítica y de expresión de PrtA-6xHis. **A)** Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche. **B)** Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt*. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. **C)** Análisis de la expresión de la proteína de fusión PrtA-6xHis por *Western blot*. Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-His como primario, y luego se utilizó anti-ratón-HRP como anticuerpo secundario. **D)** SDS-PAGE de fracciones proteicas. En todos los casos, las bacterias fueron cultivadas a 30°C durante 16 horas. SN: extractos extracelulares; ET: extractos celulares totales; M: marcador de PM.

La figura V.7 enseña los resultados obtenidos al analizar esta nueva cepa. El halo proteolítico desarrollado en placa por *prtA-6xHis* mostró magnitud intermedia entre el fenotipo silvestre (*wt*) y el de la mutante *prtA* (panel A); mientras la cuantificación de actividad a partir de sobrenadante de cultivo determinó un 33% de actividad proteasa en *prtA-6xHis* en relación a la cepa salvaje. En tanto, la cepa control *prtA* presentó en este caso un 10% de actividad relativa (panel B). A través de ensayos de *Western blot*, logramos inmunodetectar la variante etiquetada de PrtA sólo en las fracciones extracelulares (SN) de la cepa *prtA-6xHis* (panel C). Sin embargo, analizando por tinción con Coomassie el perfil proteico de estas fracciones, observamos que el patrón de proteínas de la cepa *prtA-6xHis* fue similar al de *prtA*, siendo imposible diferenciar la banda proteica que correspondería a la proteína etiquetada (panel D).

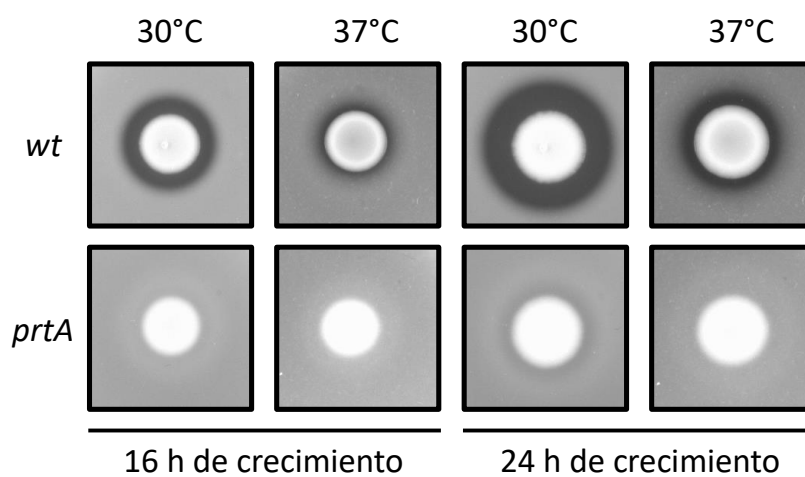
En conjunto, los resultados enunciados señalan que el agregado de la etiqueta 6xHis (al igual que el epítoto 3xFLAG) al extremo C-terminal de PrtA reduce

drásticamente sus niveles de secreción, haciendo de la cepa *prtA*-6xHis una herramienta ineficaz a los fines de estudios de expresión de dicha enzima.

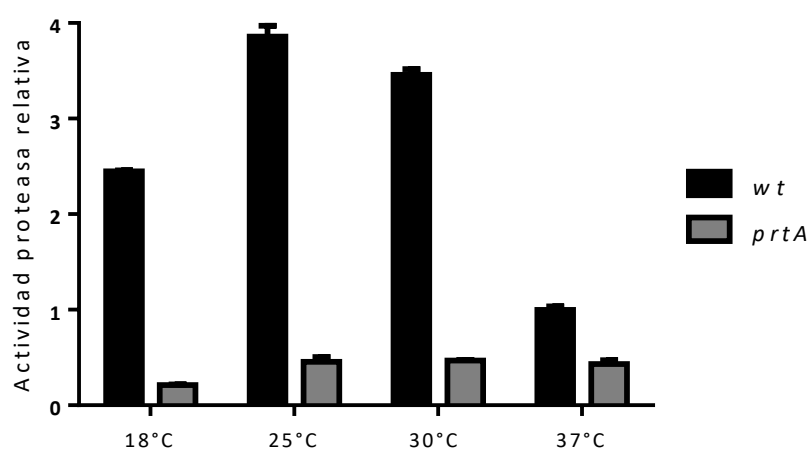
V.5. La temperatura de crecimiento es una señal moduladora para la expresión de PrtA

Previamente, se han reportado diversos fenotipos influenciados por temperatura en *Serratia*, tales como la motilidad flagelo dependiente (*swimming* y *swarming*) y la producción de exoenzimas (52, 357). Por lo tanto, llevamos a cabo determinaciones de actividad proteolítica creciendo la cepa salvaje de *Sma* RM66262 a distintas temperaturas. En la figura V.8.A, se observa que el halo proteolítico generado luego del crecimiento a 30°C fue mayor que el producido a 37°C, mientras que para la cepa *prtA*, dicho halo resultó apenas detectable para ambas temperaturas, sugiriendo que el fenotipo observado en la cepa salvaje es atribuible a la expresión de PrtA. En figura V.8.B, se muestra la cuantificación de la actividad proteasa de cultivos crecidos en medio líquido a cuatro temperaturas definidas en el rango de 18-37°C. Para la cepa salvaje, la actividad resultó máxima tras crecer las bacterias a 25°C, y se observó una reducción de 3,5 veces a 37°C respecto de 30°C. La cepa *prtA* no presentó variaciones significativas entre 25, 30 y 37°C, indicando que el fenotipo observado ocurre como consecuencia la modulación de la expresión de *prtA*. Para corroborar esto, se analizaron los extractos extracelulares de ambas cepas en estudio. Se observa en la figura V.8.C una abundante banda proteica migrando a la altura de los 50 kDa en la muestra correspondiente a la cepa *wt* cultivada a 30°C. La abundancia de esta banda fue menor cuando esta cepa se cultivó a 37°C (indicada mediante un círculo sólido). La comparación de estos perfiles proteicos con los pertenecientes a la cepa mutante *prtA* permite concluir que la banda analizada corresponde unívocamente a la serralisina PrtA. A modo de control, se analizó la DO₆₀₀ final de los cultivos *wt* y *prtA* a las distintas temperaturas de cultivo analizadas. Los valores fueron similares entre los 25, 30 y 37°C, mientras que a los 18°C se observó una módica disminución de la DO₆₀₀, tanto para la cepa *wt* como para *prtA* (figura V.8.D).

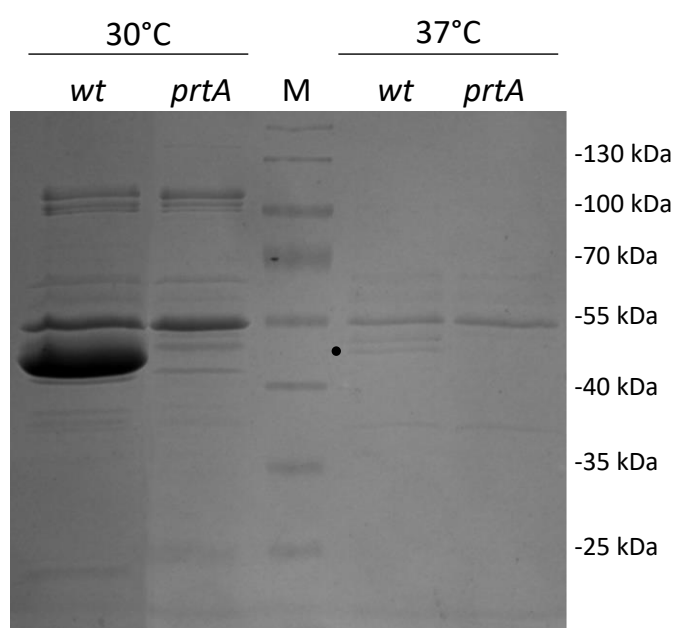
A



B



C



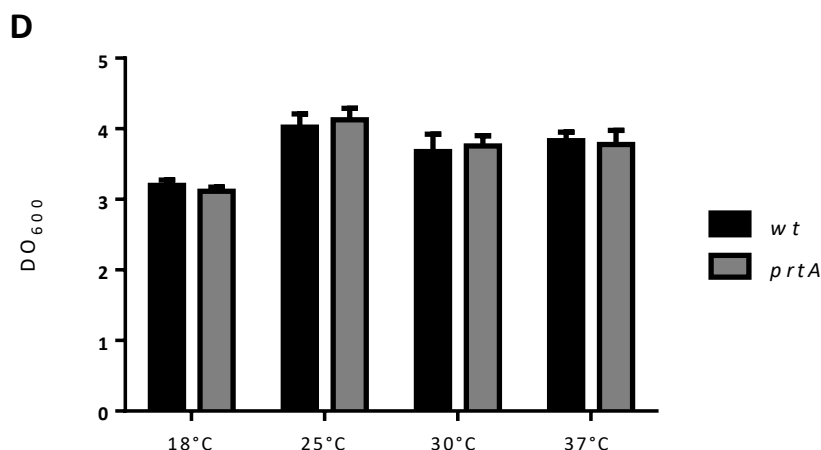


Figura V.8. Efecto de la temperatura de crecimiento bacteriano sobre la actividad proteolítica secretada. **A)** Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche, luego de 16 y 24 horas de crecimiento a la temperatura indicada. **B)** Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt* a 37°C. **C)** Perfiles proteicos de extractos extracelulares. Las cantidades sembradas son equivalentes a 1 unidad de DO₆₀₀ en todos los casos. A la derecha, se indican los pesos moleculares correspondientes al marcador (M). **D)** DO₆₀₀ cuantificada tras el crecimiento a la temperatura indicada. Para B, C y D, las bacterias fueron cultivadas en LB durante 16 horas, a la temperatura indicada. En B y D, los valores corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras de error corresponden a las desviaciones estándar.

Decidimos evaluar si la termorregulación de la actividad proteolítica se encuentra conservado en otras cepas de *Sma*. Para ello, utilizamos la cepa *Sma* Db10, previamente referida en la Introducción como una cepa entomopatogénica no pigmentada (275). Se examinó la actividad proteolítica secretada, tanto en placas LB-agar-leche como en medio líquido para la cepa salvaje (Db10 *wt*) y para una cepa mutante en *prtA* (Db10 *prtA*), construida durante este trabajo (sección III.8.4). Como se muestra en la figura V.9, se concluye que la actividad proteolítica secretada es 3,3 veces mayor al crecer las bacterias a 30°C respecto de 37°C. Por lo tanto, se conserva el fenómeno de termorregulación sobre dicha actividad. Por otra parte se observó que, en la cepa isogénica *prtA*, la actividad proteasa disminuye un 48,5% a 30°C, y un 44% a 37°C, con respecto a la cepa *wt*. Mientras que en *Sma* RM66262, la interrupción de *prtA* produce una merma promedio del 85% a 30°C y del 65% a 37°C. Estos resultados sugieren que, si bien *PrtA* es también la proteasa mayoritariamente expresada en *Sma* Db10, la contribución de otras proteasas secretadas a la actividad cuantificada sería mayor en este aislamiento con respecto a *Sma* RM66262. Una explicación tentativa es que la contribución diferencial resida en la expresión de las metaloproteasas no compartidas entre estos dos aislamientos (*SlpB* en *Sma* Db10, y *SlpE* en *Sma* RM66262).

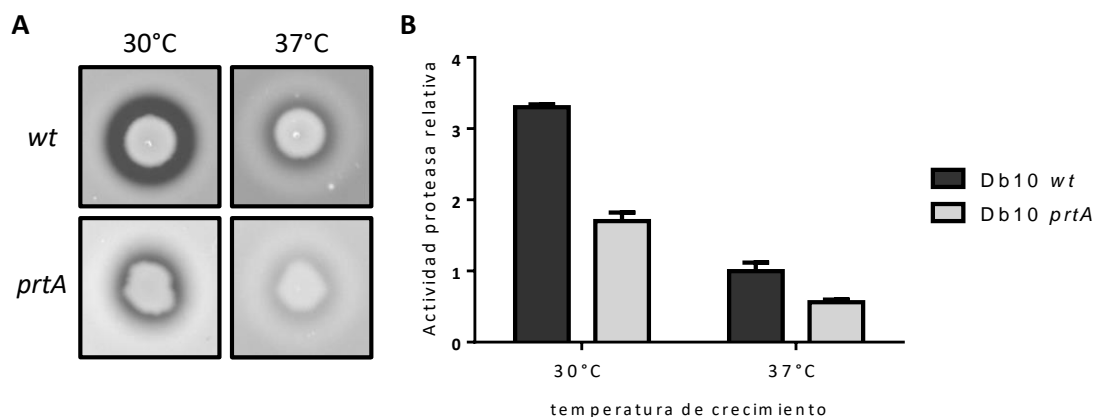


Figura V.9. Evaluación de la actividad proteolítica secretada en las cepas Db10 *wt* y *prtA* en función de la temperatura. A) Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche. B) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los obtenidos para la cepa Db10 *wt* a 37°C. Las bacterias fueron cultivadas durante 16 horas a la temperatura indicada.

Continuando con el estudio de expresión de la serralisina en *Sma* RM66262, indagamos si la modulación de *prtA* ocurre a nivel transcripcional. Para ello, se monitoreó la actividad del promotor de *prtA* en función de la temperatura y el tiempo utilizando el plásmido pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp* [ASV]. En esta construcción la proteína GFP [ASV] se encuentra bajo el control transcripcional de la región promotora putativa de *prtA* (abarcando 500 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción ATG). Los detalles de la construcción están descriptos en Materiales y Métodos, sección III.3.13. Las curvas de fluorescencia graficadas en la figura V.10.A mostraron que la actividad del promotor sólo fue detectable a partir de la fase post-exponencial de crecimiento (4-5 horas de incubación). Durante esta etapa, la actividad del promotor *prtA* se incrementó 2,6 veces a 30°C respecto de 37°C. En paralelo, se evaluaron los niveles de transcripto de *prtA* en función de ambas temperaturas de crecimiento por medio de RT-qPCR. Como se observa en la figura V.10.B, los niveles de transcripto a 30°C resultaron en promedio 40 veces mayores que los obtenidos para 37°C.

En suma, estos resultados muestran que existe un componente a nivel transcripcional en la regulación por temperatura de la expresión de PrtA. La diferencia de magnitud entre los resultados obtenidos utilizando RT-qPCR y el sistema reportero GFP radica en la naturaleza misma de las técnicas. Mediante la primera, se estiman los niveles de estado estacionario del transcripto *prtA*; mientras que la segunda técnica es una medida indirecta de la actividad del promotor P_{*prtA*}, que -al basarse en un sistema episomal- podría estar perdiendo aspectos importantes de la regulación en el ambiente nativo del nucleóide bacteriano. Asimismo, desconocemos si la eficacia de plegamiento de la proteína reportera GFP [ASV] es la misma a ambas temperaturas

ensayadas. Para corroborar esto, se debería expresar dicha proteína bajo el control de un promotor constitutivo y examinar si la fluorescencia varía entre los 30 y los 37°C.

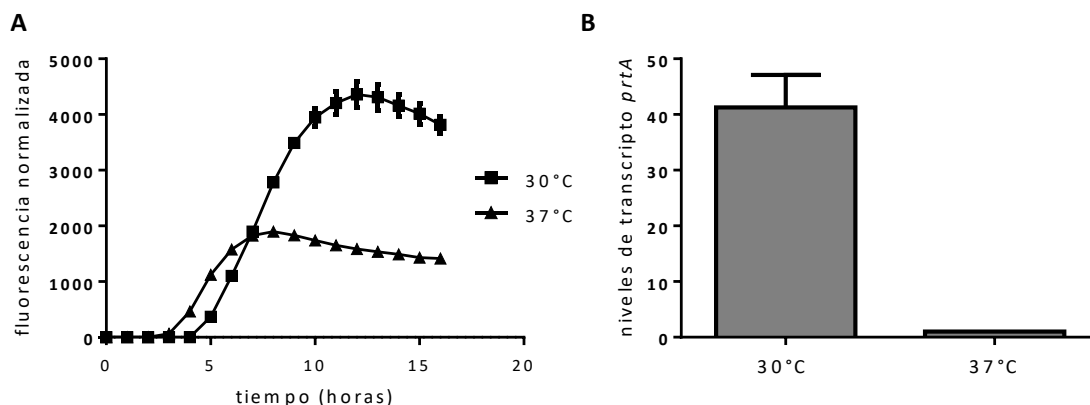


Figura V.10. Evaluación de la transcripción de *prtA* en función de la temperatura de crecimiento bacteriano. A) Actividad transcripcional del plásmido reportero pPROBE::*P_{prtA}-gfp* [ASV]. La expresión transcripcional de *prtA* se cuantificó utilizando el reportero plasmídico pPROBE::*P_{prtA}-gfp*. El valor de fluorescencia obtenido para cada punto fue normalizado respecto a la DO₆₀₀ del cultivo. B) Cuantificación del transcritto de *prtA* mediante RT-qPCR. La expresión de *prtA* en cultivos bacterianos crecidos durante 16 horas a la temperatura indicada fue medida por qPCR, según se describe en la sección III.3.6. El nivel de expresión obtenido para el crecimiento a 37°C se normalizó a 1, y el del crecimiento a 30°C se relativizó a éste. Se muestra el promedio (n = 2 muestras de ARN independientes) y la desviación estándar.

Al momento de la escritura de esta Tesis, en nuestro laboratorio, el Dr. Javier Mariscotti se encuentra evaluando la actividad transcripcional del operón *lipBCD* entre los 30 y los 37°C, a través de la utilización del plásmido reportero pPROBE::*P_{lip}-gfp*, que contiene una fusión transcripcional entre el promotor del operón *lipBCD* y el gen *gfp*; y de ensayos de RT-qPCR. Se determinará si la modulación transcripcional dependiente de temperatura de la serralisina PrtA, se coordinada con una regulación análoga de los componentes que forman su translocador específico.

La disminución de la expresión de PrtA durante el crecimiento a 37°C, respecto del crecimiento a temperaturas ambientales, podría sugerir que esta metaloproteasa no sería un factor de virulencia importante en hospedadores de sangre caliente. Sin embargo, la interrupción de *prtA* disminuye la virulencia -en comparación a la cepa *wt*- al administrar a *Sma* por vía intravenosa en un modelo de ratón (81). Entonces, a pesar de su expresión disminuida a 37 °C, PrtA todavía podría ser un potencial factor de virulencia a esta temperatura. De manera interesante, al analizar la expresión de la hemolisina ShIA nos encontramos con un panorama similar. La actividad hemolítica óptima se observa a 30 °C, reduciéndose hasta 10 veces a 37°C (358). Pero la eliminación de *shIBA* anula la virulencia en un modelo de ratón y la citotoxicidad contra

múltiples líneas celulares de mamíferos, indicando su importancia como factor de virulencia en hospedadores de sangre caliente (24).

V.6. Búsqueda de factores termorregulatorios para *PrtA*

Con el propósito de examinar los mecanismos regulatorios que gobiernan la termorregulación en la expresión de *prtA*, evaluamos una serie de cepas mutantes de *Sma* RM66262 para diversos factores de transcripción, analizando el fenotipo proteolítico creciendo las cepas a 30 o 37°C. Las cepas *cpxR*, *ompR*, *flhD*, *fliA*, *phoP* y *rscB* se encontraban disponibles en el stock del laboratorio, mientras que la cepa *rssB* fue construida durante el presente Trabajo de Tesis (sección III.8.1).

Los reguladores flagelares *FlhD* y *FliA* y el sistema *CpxR* fueron descritos en la parte introductoria (I.1.4.4 y I.3.2, respectivamente).

Los sistemas *EnvZ-OmpR*, *PhoPQ*, *RssBA* son TCS clásicos, donde *ompR*, *phoP*, y *rssB* codifican para los RR citoplasmáticos, respectivamente. En *Xenorhabdus nematophila*, se reportó que *OmpR* modula negativamente –a través de *FliA* y *FlhDC*– la expresión de exoenzimas, entre ellas, *XrtA*, de la familia de las serralisinas (359). Por ende, se creyó conveniente ensayar tanto la cepa *ompR* como las mutantes flagelares *fliA* y *flhD*. *PhoPQ* de *Sma* interviene en la regulación de la resistencia a polimixina B y a pH ácido, en el crecimiento en baja concentración de Mg^{2+} , y también en los mecanismos de supervivencia de este patógeno en células epiteliales, interviniendo en la evasión de la maquinaria degradativa de la célula eucariota (22). El sistema *RssBA* de *Sma* es capaz de responder a cambios de temperatura: a 37°C, se encuentra activo y *RssB* fosforilado reduce la expresión de *flhDC*, el regulador maestro flagelar. Esto favorece la formación de biopelículas sobre la motilidad *swarming*, e indirectamente disminuye la producción de hemolisina. A 30°C, se encontraría inactivo, permitiendo mayores niveles de expresión de *flhDC*, y por ende, promoviendo la motilidad *swarming* y la producción de hemolisina (360).

Por otro lado, el sistema *Rcs* es un sistema de fosfotransferencia. La parte central del sistema se compone de tres proteínas separadas con cuatro dominios de señalización. La proteína sensora *RcsC*, una quinasa híbrida que contiene el dominio transmisor H1 y el dominio receptor D1; *RcsD*, contiene el dominio de fosfotransferencia HPT; y el regulador de respuesta citoplasmático *RcsB*, que presenta un dominio receptor conservado D2 (361). En nuestro laboratorio se ha determinado que, en *Sma*, el sistema *Rcs* en su estado activo reprime transcripcionalmente de forma directa la expresión del regulón flagelar (48, 273). Asimismo, se determinó que

RcsB fosforilado regula negativamente de manera directa la expresión del operón *shlBA*, codificante para la hemolisina (21).

A partir de cultivos saturados de cada una de estas cepas, se inocularon aproximadamente 8×10^{-3} unidades de DO_{600} en placas LB-agar-leche, y se incubaron durante 24 horas a 30°C o 37°C, según se indica. En la figura V.11.A, se observa que todas las cepas ensayadas presentaron halos degradativos de mayor tamaño a 30 °C respecto de 37 °C, lo cual sugiere que la termorregulación de *prtA* no depende de ninguno de los factores de transcripción analizados.

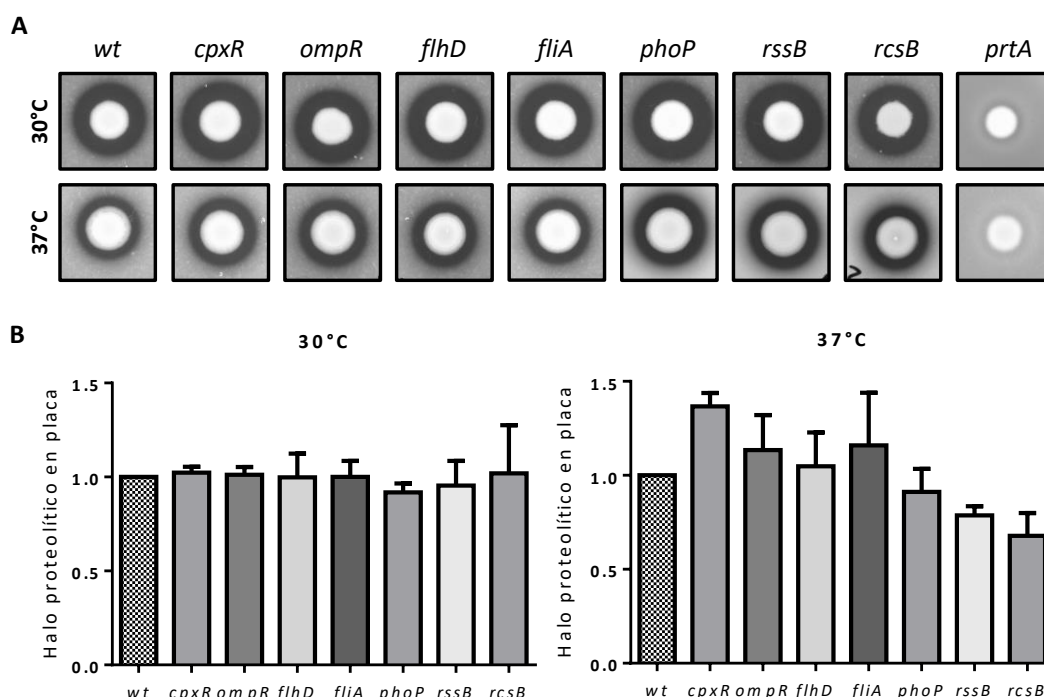


Figura V.11. Evaluación de la termorregulación de la actividad proteolítica secretada en una serie de cepas mutantes. A) Halo proteolítico en placas de LB-agar-leche tras 24 horas de incubación. B) Análisis semi-cuantitativo de la actividad proteasa en placa. Para cada cepa, se calculó el cociente entre el diámetro del halo proteolítico y el diámetro de la colonia bacteriana. El valor obtenido fue a su vez relativizado a los valores presentados por la cepa *wt*. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

Sin embargo, de manera interesante, la estimación semi-cuantitativa de la actividad proteasa efectuada en base a los diámetros de los halos y de las colonias bacterianas, mostró un aumento del 40% en la cepa *cpxR* respecto a la cepa salvaje a 37°C; en tanto que a 30°C no se detectaron diferencias para este fenotipo. Para complementar este hallazgo, se prepararon los sobrenadantes de cultivo de las cepas salvaje y *cpxR* crecidas durante 24 horas y se efectuó la cuantificación de actividad proteasa. De modo similar, observamos un fenotipo dependiente de temperatura, con un 50% de incremento en la actividad para la cepa mutante a 37°C, y sin diferencias apreciables entre cepas a 30°C (figura V.12.A). Por otra parte, el análisis de los perfiles proteicos extracelulares reveló mayor abundancia de la banda proteica

correspondiente a la serralisina PrtA en la cepa *cpxR* en comparación con la cepa salvaje (figura V.12.B), indicando que CpxR cumpliría un rol en la regulación de la expresión de PrtA a través de una modulación negativa de su expresión.

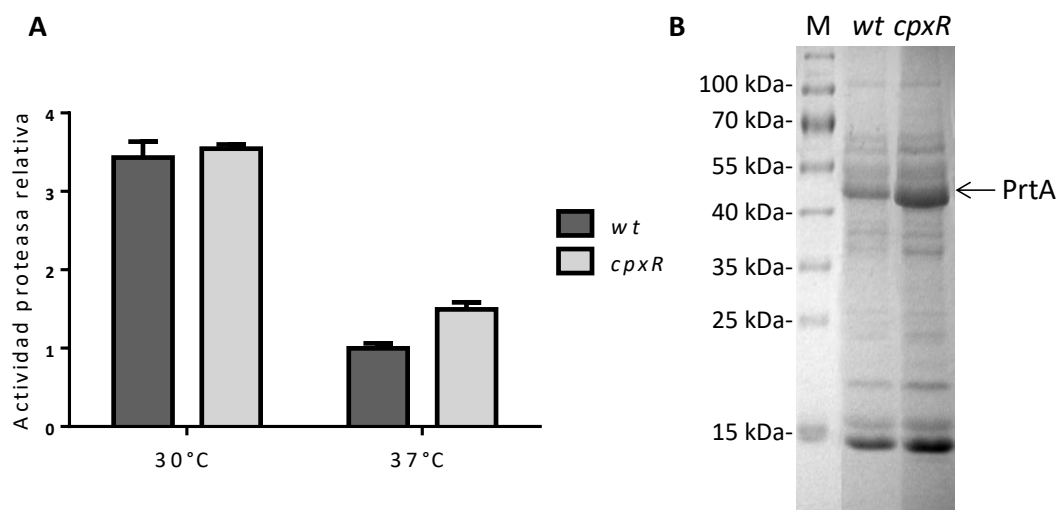


Figura V.12. Evaluación de la actividad proteolítica y expresión de PrtA en las cepas salvaje y *cpxR*. **A)** Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los obtenidos para la cepa *wt* a 37°C. Los sobrenadantes fueron preparados a partir de cultivos crecidos en medio LB durante 24 horas, a la temperatura señalada. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. **B)** SDS-PAGE de extractos extracelulares. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 24 horas. Las células se separaron por centrifugación, obteniendo el sobrenadante de cultivo, que fue luego concentrado por precipitación con TCA. Se sembró el equivalente a 2 unidades de DO_{600} para cada muestra.

Adicionalmente, la cepa *cpxR* se complementó en *trans* mediante la expresión de CpxR desde el plásmido pBB5::*cpxR*, inducible por IPTG, logrando restaurar los niveles de actividad proteolítica a niveles salvajes, tanto en placa como en medio líquido, corroborando el fenotipo dependiente de CpxR (figura V.13). En suma, estos resultados indican que CpxR es capaz de ejercer una acción inhibitoria sobre la expresión de *prtA* a 37°C y no a 30°C. Si bien la cepa *cpxR* conserva el fenotipo de termorregulación de la actividad proteolítica, los resultados sugieren que la represión mediada por el sistema Cpx contribuye parcialmente con dicho fenómeno. En consecuencia, la termorregulación de la expresión de la serralisina PrtA es un fenotipo multifactorial, que no sería dirigido por la simple acción de un regulador transcripcional.

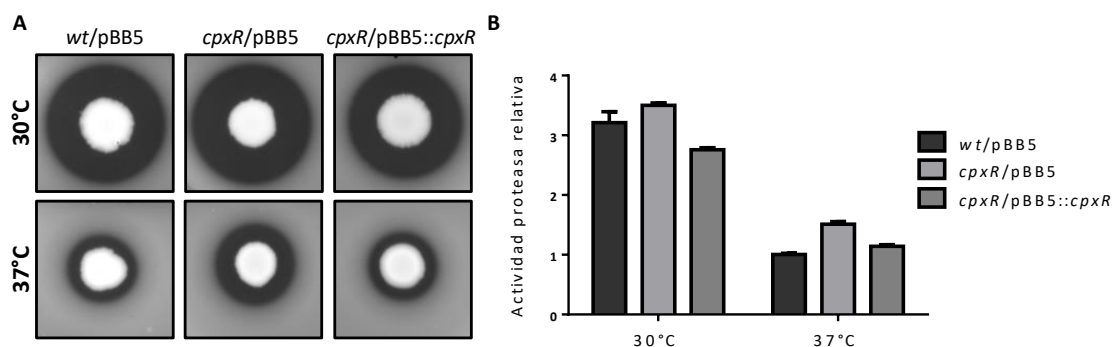


Figura V.13. Evaluación de la complementación de la actividad proteolítica en la cepa *cpxR*. A) Halo proteolítico en placas LB-agar-leche. B) Actividad proteolítica cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa salvaje con el vector vacío (*wt/pBB5*). Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas a la temperatura indicada durante 24 horas. Los medios de cultivo fueron suplementados con kanamicina (50 µg/µl) e IPTG 200 µM.

V.7. CpxR regula a nivel transcripcional la expresión de *prtA*

Con el objetivo de definir si los fenotipos descritos en el apartado anterior corresponden a una modulación a nivel transcripcional sobre la región promotora del gen *prtA*, se cuantificó la actividad transcripcional de dicho gen en función del tiempo en las cepas salvaje y *cpxR*, mediante la utilización de la construcción reportera pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp* [ASV]. Las cepas se crecieron a 30 o 37°C (figura V.14). Se observó que en ausencia de CpxR la actividad transcripcional de *prtA* fue aproximadamente el doble a 37°C. En cambio, a 30°C, no se detectaron diferencias entre los patrones transcripcionales de ambas cepas. Esto es congruente con el aumento de expresión de serralisina en la cepa *cpxR* descrito anteriormente, sólo observable al crecer las bacterias a 37°C.

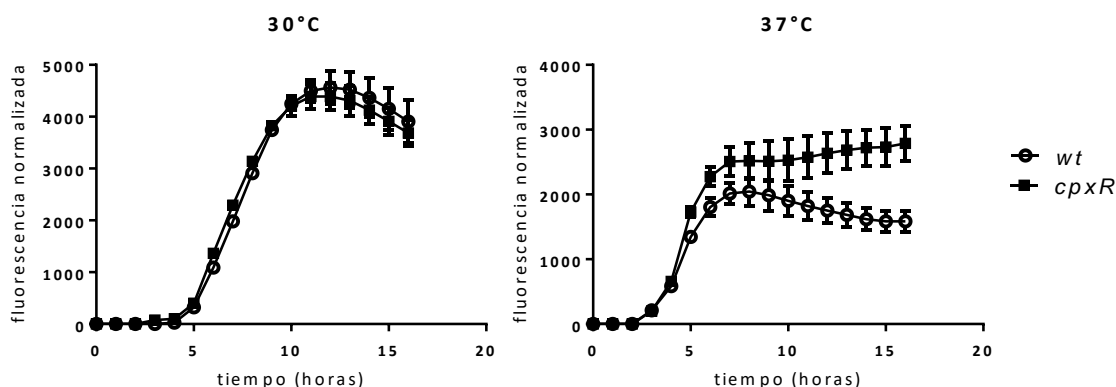


Figura V.14. Actividad transcripcional del plásmido reportero pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp* [ASV]. La expresión transcripcional de *prtA* se cuantificó utilizando el reportero plasmídico pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp*. El valor de fluorescencia obtenido para cada punto fue normalizado respecto a la DO₆₀₀ del cultivo. Los cultivos se crecieron a 30 o 37°C en microplacas durante 16 horas. Las curvas representan la media de tres experimentos independientes, y las barras de error las desviaciones estándar.

De manera complementaria, se evaluaron los niveles transcripcionales de *prtA* en ambas cepas en estudio por experimentos de RT-qPCR (figura V.15). La cuantificación del transcripto resultó ser 11 veces mayor en la cepa *cpxR* respecto de la cepa salvaje, para cultivos crecidos a 37°C. En suma, los resultados obtenidos señalan que en *Sma* el sistema CpxRA se encuentra modulando negativamente la transcripción de *prtA* cuando las bacterias son cultivadas a 37°C.

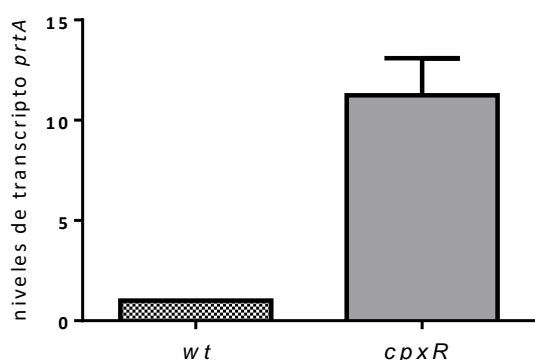


Figura V.15. Cuantificación del transcripto de *prtA* en el entonrno *cpxR* mediante RT-qPCR. La expresión de *prtA* en cultivos bacterianos crecidos hasta fase estacionaria a 37°C fue medida por RT-qPCR. Los valores se obtuvieron por método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando los niveles de transcripto 16S como referencia. El nivel de expresión obtenido para la cepa salvaje se normalizó a 1, y el de la cepa *cpxR* se relativizó a éste. Se muestran las medias (n=2 muestras de ARN independientes) y las desviaciones estándar.

V.8. Determinación de la interacción de CpxR con la región promotora de *prtA*

Con el propósito de determinar si CpxR ejerce una regulación directa sobre la expresión de *prtA*, se realizó un rastreo bioinformático en la región promotora de dicho gen en busca de un sitio de unión putativo de CpxR. En primer lugar, a través del servidor MEME (*Multiple EM for Motif Elicitation*), se construyó el motivo consenso de unión a CpxR usando una serie de regiones promotoras que contienen secuencias de reconocimiento *bona-fide* para esta proteína. Posteriormente, a través de la herramienta FIMO (*Find Individual Motif Occurrences*) (294), se encontró un sitio de unión putativo 206 pb corriente arriba del codón de inicio traduccional de *prtA*. Dicha secuencia mostró 14 de las 16 bases conservadas del logo obtenido.



Figura V.16. Análisis y detección *in silico* de una secuencia consenso de unión para CpxR. El motivo consenso de unión a CpxR fue generado entrenando el servidor MEME usando como datos los promotores de los genes regulados por CpxR de *Salmonella* ya conocidos. La matriz obtenida luego fue utilizada para buscar motivos en la secuencia promotora de *prtA* mediante el servidor FIMO. El procedimiento se detalla en Materiales y Métodos, sección III.19.

En vista de este resultado, decidimos evaluar si CpxR es capaz de interaccionar *in vitro* con la región regulatoria putativa de *prtA*. Para ello, llevamos a cabo ensayos de retardo de la movilidad electroforética del ADN (EMSA) utilizando el fragmento de ADN correspondiente a los 500 pb corriente arriba del codón de inicio de *prtA*, y la proteína purificada CpxR-6xHis, cuyo clonado, expresión y purificación se detallan en la sección III.12 de Materiales y Métodos. Se detectó una única banda de retardo utilizando 6 pmoles del regulador de respuesta purificado (figura V.17), sugiriendo la presencia de un único sitio de unión a CpxR en el fragmento de ADN analizado. Un exceso de entre 20 y 350 veces de un fragmento de ADN competidor inespecífico (correspondientes a la región codificante del gen *nucA*) no afectó la interacción, mientras que la banda de retardo disminuyó su abundancia por agregado de 20 veces del fragmento de ADN del promotor *prtA* sin marcar (*PprtA*), indicando que la interacción del regulador de respuesta con el fragmento promotor de *prtA* es específica.

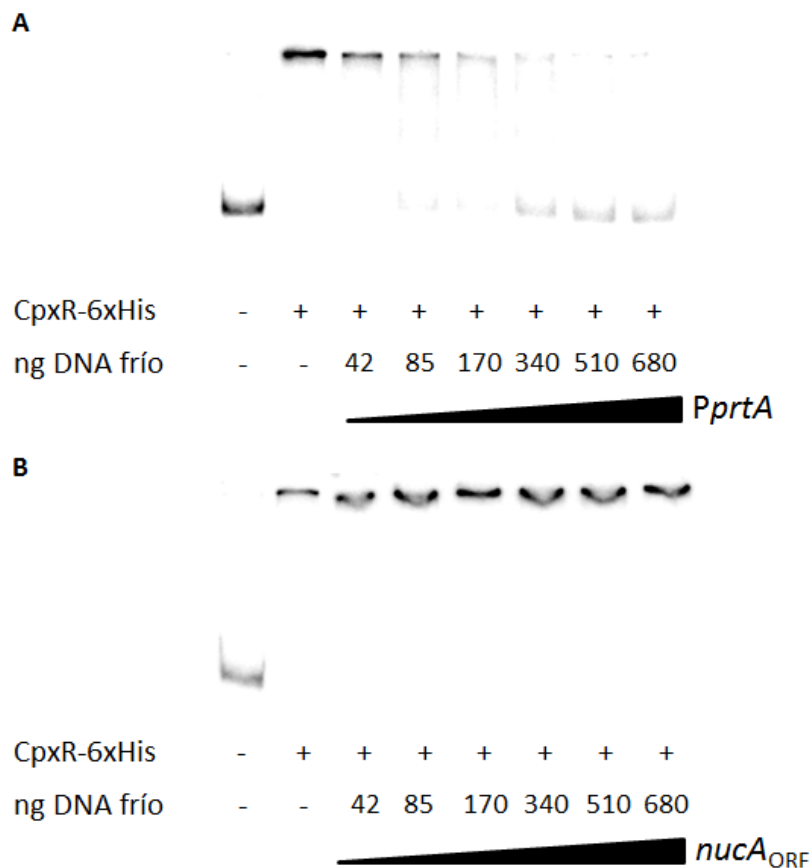
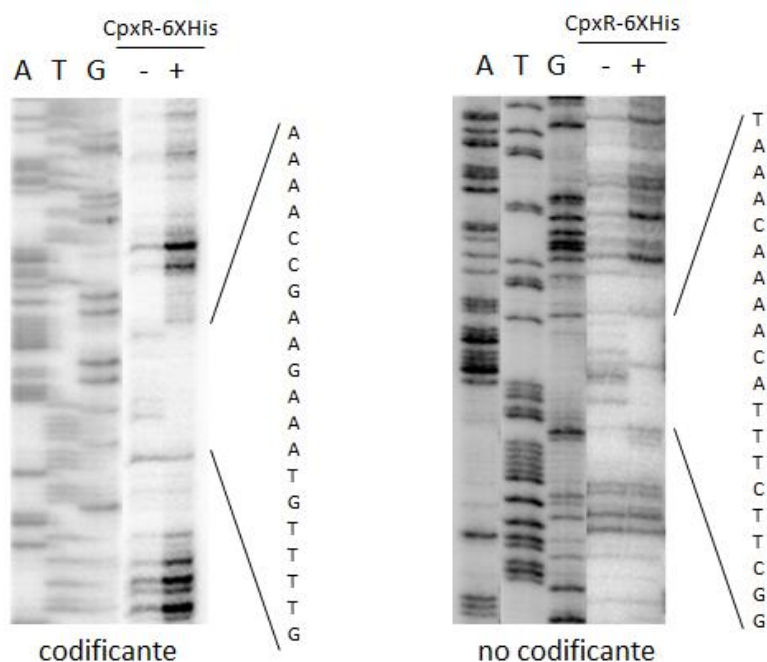


Figura V.17. Ensayo de retardo electroforético del ADN. El fragmento de ADN correspondiente a la región promotora de *prtA* fue amplificado por PCR utilizando el cebador reverso marcado radioactivamente con ³²P. Aproximadamente 15 ng de esta sonda marcada fueron incubados con 6 pmoles de CpxR-6xHis purificada. A dicha mezcla de reacción se añadieron cantidades crecientes de sondas de ADN sin marcar correspondientes al promotor de *prtA* (*PprtA*) o bien a una parte de la región codificante de *nucA* (*nucA_{ORF}*), según se indica. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos, secciones III.13.1-2.

Para determinar el sitio de unión de CpxR en la región promotora de *prtA*, se efectuó un ensayo de protección de la ADNasa I, utilizando CpxR-6xHis y sondas de ADN marcados radioactivamente en la hebra codificante o en la hebra no codificante. Como se muestra en la figura V.18, CpxR-6XHis protegió una región superpuesta desde el nt 217 al nt 239 relativo al sitio de inicio de la traducción de *prtA*. La región protegida se superpone con el sitio de unión para CpxR predicho previamente *in silico*. En conjunto, estos resultados demuestran que CpxR es capaz de unirse de forma directa al motivo de reconocimiento consenso en la región promotora de *prtA*, en las condiciones *in vitro* ensayadas.



5'-GTTTCATTTGTTTTGTAAAGAAGCCAAAAAAGCAGCAT...3'
3'-CAAAGTAAACAAAACATTTCTTCGGTTTTTTCGTCGTA...-5'

Región promotora *p_{prtA}*

Figura V.18. Ensayo de protección a la ADNasa I. El ensayo se realizó sobre ambas hebras de la sonda marcada *prrA*, según se especifica en Materiales y Métodos, secciones III.13.3-4. Las cantidades de CpxR-6XHis agregadas a la sonda fueron 50 pmoles de proteína fosforilada con acetil fosfato (+), y 0 pmoles (-). En la parte inferior de la figura se indica la secuencia de la región promotora de *prrA*. La región subrayada representa la zona protegida por CpxR-6XHis, mientras que la secuencia resaltada en negrita representa los motivos de unión a CpxR predichos *in silico*.

V.9. El nivel de actividad del sistema CpxRA depende de la temperatura de crecimiento bacteriano

Como se expuso en la sección V.7, nuestros resultados indicaron que la represión mediada por CpxR sobre la expresión de *prtA* es ejercida a 37°C pero no a 30°C, sugiriendo que la actividad del sistema CpxRA podría estar siendo afectada por la temperatura de crecimiento de *Serratia*. A nuestro entender, no existen reportes previos que describan modulación por temperatura sobre este sistema de dos componentes. Por lo tanto, decidimos examinar el perfil transcripcional de otro miembro del regulón CpxRA en función de la temperatura. Recapitulando lo desarrollado en la Introducción, en *E. coli* y *Salmonella*, se ha descrito que el gen *cpxP* es el que presenta una mayor magnitud de modulación transcripcional positiva -mediada por CpxR- en comparación con lo demás miembros del regulón Cpx (214, 215). CpxP actúa como proteína auxiliar cumpliendo un rol en la regulación negativa del sistema CpxRA, a través de su unión a CpxA y la consecuente inhibición de la autofosforilación (208). Debido a que su distribución no es ubicua en enterobacterias (362), indagamos la presencia de *cpxP* en el genoma de *Sma* RM66262 a través de la herramienta BLASTP del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando como referencia la secuencia aminoacídica de CpxP de *Salmonella* LT2. Como resultado, corroboramos la existencia de dicho gen en nuestro aislamiento, el cual codifica para una proteína que comparte un 79% de identidad aminoacídica con su homóloga de *Salmonella*. Posteriormente, determinamos el perfil de expresión de *cpxP* en *Sma* RM66262 mediante RT-qPCR, a partir de bacterias crecidas hasta la fase estacionaria a 30°C o a 37°C.

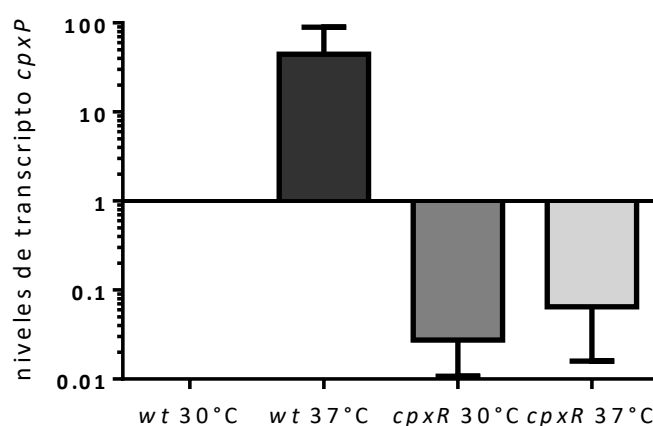


Figura V.19. Cuantificación del transcritpo de *cpxP* mediante RT-qPCR. La expresión de *cpxP* en cultivos bacterianos pertenecientes a la cepa *wt* o *cpxR* crecidos durante 16 horas a la temperatura indicada fue medida por RT-qPCR. Los valores se obtuvieron por método del $2^{-\Delta\Delta CT}$, utilizando los niveles de transcritpo 16S como referencia. El nivel de expresión obtenido para la cepa salvaje cultivada a 30°C se normalizó a 1, y el resto de los niveles se relativizaron a éste. Se muestran las medias (n=2 muestras de ARN independientes) y las desviaciones estándar.

Como se observa en la figura V.19, para la cepa salvaje los niveles transcripcionales de *cpxP* se incrementaron en promedio 45 veces al ser cultivada a 37°C respecto de 30°C. La expresión escasa de *cpxP* detectada en el entorno *cpxR* confirma la pertenencia de *cpxP* al regulón CpxRA en *Sma*. Asimismo, no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión a 30°C y 37°C en el entorno *cpxR*. Esto indica que la inducción de la expresión de *cpxP* a 37°C observada en la cepa salvaje es dependiente de CpxRA. Por otra parte, resultados preliminares obtenidos durante la escritura del presente Trabajo de Tesis señalaron un incremento del 50% en la expresión de *dsbA* –otro miembro del regulón CpxRA- al crecer bacterias de la cepa salvaje a 37°C respecto de 30°C. Dicha variación no se observó en muestras provenientes de la cepa mutante *cpxR*.

En suma, estos análisis de expresión sugieren que, en *Sma*, el sistema CpxRA se encuentra en un nivel de actividad mayor durante el crecimiento en fase estacionaria a 37° respecto de 30°C. Conjeturamos que el sistema Cpx podría estar sensando indirectamente la temperatura de crecimiento. Es probable que la magnitud de las perturbaciones de membrana y/o la acumulación de componentes mal plegados en la envoltura se incremente de modo concomitante con la temperatura, entonces, estas señales repercutirían sobre el nivel de actividad del sistema Cpx.

V.10. Señales inductoras del sistema CpxRA modulan la expresión de PrtA

Con el objeto de profundizar el conocimiento acerca del rol del sistema CpxRA en la regulación de la expresión de PrtA, evaluamos si el crecimiento de las bacterias en condiciones descriptas como inductoras del sistema CpxRA impacta en los niveles de actividad proteolítica secretada.

Se ha reportado que la sobreexpresión de NlpE, una lipoproteína de membrana externa, provoca la inducción del sistema CpxRA tanto en *E. coli* (212) como en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (López M.C., tesis doctoral). Por lo tanto, decidimos sobre-expresar NlpE en los entornos salvaje, *cpxR*, y *prtA* de *Sma*. Esta sobreexpresión se efectuó a partir del plásmido pSU::*nlpE*, que codifica y expresa constitutivamente el gen *nlpE* de *Salmonella* Typhimurium. La proteína NlpE expresada desde este plásmido posee un 49% de identidad aminoacídica con la de *Sma* RM66262.

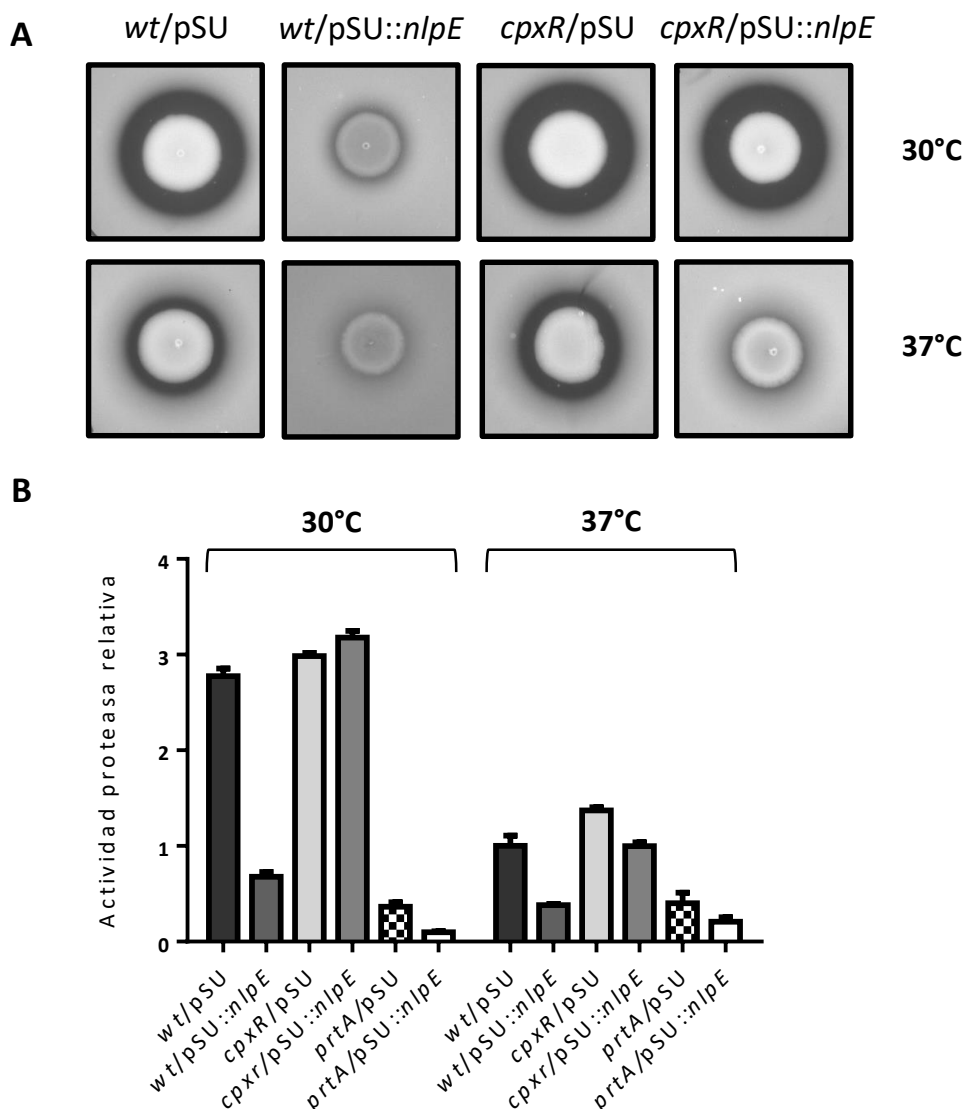


Figura V.20. Efecto de la sobreexpresión de NlpE sobre la actividad proteolítica secretada en los entornos *wt*, *cpxR* y *prtA*. A) Halo proteolítico en placas LB-agar-leche **B)** Actividad proteolítica cuantificada por degradación de azocaseína. Los valores de actividad se indican en relación a los valores obtenidos para la cepa salvaje con el vector vacío (*wt/pSU*) crecida a 37°C. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias se cultivaron durante 24 horas a la temperatura indicada.

La figura V.20 muestra que la sobreexpresión de NlpE en el entorno salvaje (*wt/pSU::nlpE*) causa una drástica disminución del halo proteolítico en placa respecto a la cepa control (*wt/pSU*). Dicha disminución se observó a ambas temperaturas de crecimiento ensayadas, y se correlacionó con las determinaciones de los niveles de actividad proteolítica en cultivos líquidos: al sobre-expresar *nlpE*, hubo una merma de 4,1 veces a 30°C, y de 2,6 veces a 37°C, respecto de la cepa salvaje. Por otra parte, no se observaron diferencias entre las cepas *cpxR/pSU* y *cpxR/pSU::nlpE* tanto en medio sólido como líquido a 30°C, corroborando que la vía CpxRA es responsable de la inhibición de la actividad proteasa observada en la cepa *wt/pSU::nlpE* CpxRA.Sin

embargo, a 37°C, la cepa *cpxR/pSU::nlpE* mostró una disminución tanto del halo proteolítico en placa como en la actividad proteasa detectada en sobrenadantes de cultivo, en comparación con la cepa *cpxR/pSU*. Hipotetizamos que la sobreexpresión de NlpE –probablemente por su carácter heterólogo- genera otro tipo de estrés adicional, que -a 37°C- repercute negativamente sobre los niveles de expresión de actividad proteolítica secretada. Por otra parte, vemos que la escasa actividad detectada en cultivos de la cepa *prtA/pSU* se redujo aún más en la cepa *prtA/pSU::nlpE*, lo que sugiere que la sobreexpresión de NlpE sería una señal moduladora negativa que también afectaría la expresión del resto de las proteasas secretadas de *Sma*, posiblemente también a través del sistema CpxRA.

A continuación, se evaluó el efecto del pH del medio de crecimiento sobre la actividad proteolítica secretada. Se ha reportado que el pH alcalino o neutro constituye una señal estimuladora del sistema, mientras que el crecimiento a pH ácido mantiene el sistema sin inducir (215, 363). En este contexto, se determinaron los niveles proteolíticos de las cepas salvaje y *cpxR* crecidas a 37°C en medio LB-MES-MOPS tamponado a pH 5 (como condición ácida) o a pH 8 (como condición alcalina).

El análisis de los resultados obtenidos es complejo. A pH 8, la niveles actividad proteolítica secretada -tanto en placa o en sobrenadantes de cultivo- fueron menores para ambas cepas que los normalmente obtenidos al cultivar las bacterias en medio LB (cuyo pH es de 7). Asimismo, a pH 8, el fenotipo *cpxR* dependiente fue de menor magnitud respecto a las medidas previas en medio LB: el incremento promedio en la actividad proteolítica de *cpxR* fue del 25% respecto a la cepa salvaje (figura V.21), en comparación con el 50% de incremento detectado al realizar el mismo experimento en LB (figura V.12). En cambio, a pH 5, no se detectaron diferencias significativas entre las cepas *wt* y *cpxR*, lo cual es congruente con el hecho de que -a pH ácido- el sistema CpxRA se encuentra inactivo, y por tanto es incapaz de modular la transcripción de *prtA*. Sin embargo, de manera inesperada, a pH 5 se duplicaron los niveles proteolíticos respecto a pH 8 (figura V.21.B). Los niveles de la cepa control *prtA* no se afectaron, lo que indica que esta modulación ocurre a nivel de PrtA.

Todos estos resultados nos permiten especular con la existencia de mecanismos regulatorios independientes del sistema Cpx. Se puede hipotetizar sobre factores que repriman la expresión de PrtA a pH alcalino, o bien, que modulen positivamente su expresión a pH ácido. En este contexto, se ha descrito la existencia de mecanismos de respuesta a estrés ácido en enterobacterias, como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*. Uno de los mecanismos principales es la inducción de aminoácidos

descarboxilasas, las cuales elevan el pH intracelular al consumir un protón durante la reacción enzimática, para luego intercambiar el producto descarboxilado por un nuevo aminoácido sustrato a través de un sistema de antiporte de membrana (364). La inducción de PrtA durante el crecimiento a pH ácido podría proveer a las bacterias de una mayor disponibilidad de aminoácidos libres en el medio extracelular, contribuyendo al efecto homeostático provocado por las descarboxilasas citosólicas.

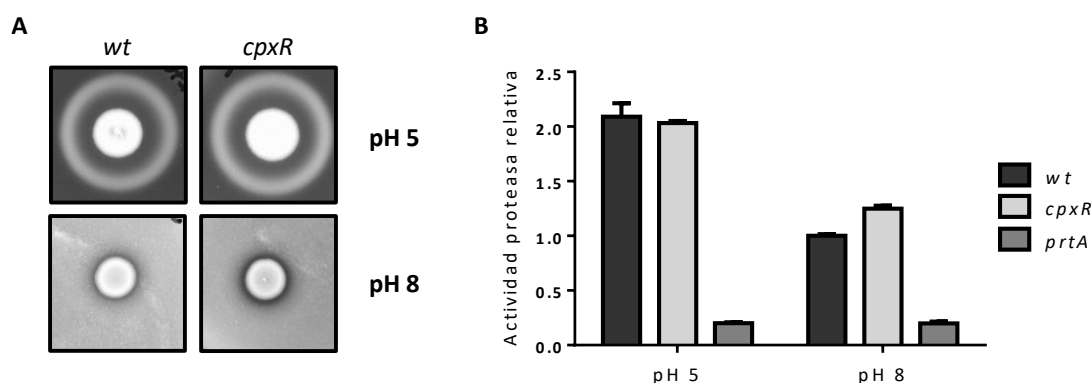


Figura V.21. Efecto del pH del medio de cultivo sobre la actividad proteolítica secretada. A) Halo proteolítico en placas LB-MES-MOPS-agar-leche. B) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt* a pH 8. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias se cultivaron durante 24 horas a 37°C.

V.11. La osmolaridad es una señal moduladora de la expresión de *prtA*

La osmolaridad constituye también una señal frecuentemente detectada por los patógenos gram negativos, y es capaz de regular factores de virulencia. Por ejemplo, en *Vibrio cholerae*, la producción de determinantes de virulencia como la toxina colérica, requiere del regulador respuesta ToxR y está influenciada por condiciones externas incluyendo osmolaridad, pH, y temperatura (365). En este contexto, decidimos evaluar si la actividad proteolítica de *Sma* varía en función de la osmolaridad del medio de crecimiento. Se evaluó la actividad proteasa tanto en medio sólido como líquido en concentraciones crecientes de NaCl. Para ello, se utilizaron los medios de crecimiento SLB (sin NaCl), LB (0,15 M NaCl) y Na-LB (0,45 M NaCl). Los resultados presentados en la figura V.22 muestran que la actividad proteasa disminuye en la cepa salvaje a medida que aumentamos la concentración de NaCl. Los halos proteolíticos de la cepa control *prtA* indican que la modulación negativa de la actividad proteolítica por estrés osmótico se produce a nivel de expresión de la serralisina PrtA.

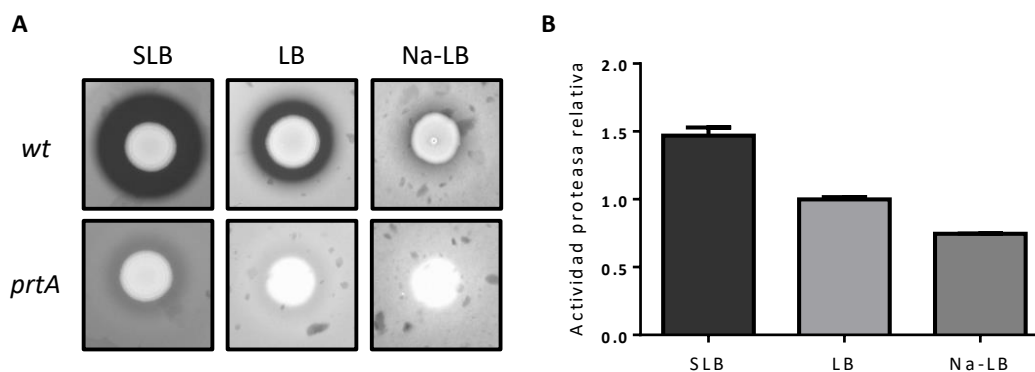


Figura V.22. Efecto de la osmolaridad del medio de cultivo sobre la actividad proteolítica secretada. A) Halo proteolítico en placas LB-agar-leche. B) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa *wt* crecida en LB. Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 16 horas.

A continuación, se determinó si esta modulación ocurre a nivel de la transcripción de *prtA*. Para ello, se monitoreó la actividad del promotor de *prtA* mediante la utilización de la construcción reportera pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp* [ASV], en los distintos medios de crecimiento ensayados previamente.

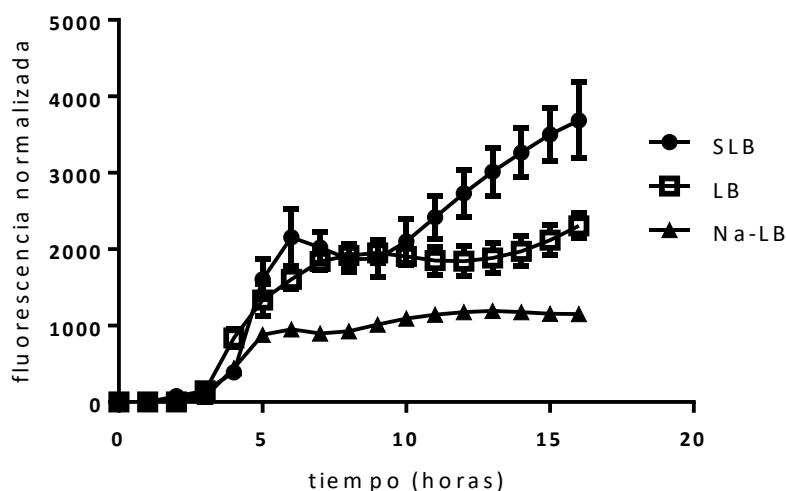


Figura V.23. Actividad transcripcional del plásmido reportero pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp* [ASV]. La expresión transcripcional de *prtA* se cuantificó utilizando el reportero plasmídico pPROBE::P_{*prtA*}-*gfp*. El valor de fluorescencia obtenido para cada punto fue normalizado respecto a la DO₆₀₀ del cultivo. Los cultivos se crecieron en el medio indicado suplementado con Km (50 µg/ml) a 37°C durante 16 horas. Las curvas representan la media de tres experimentos independientes, y las barras de error las desviaciones estándar.

Se observó que la actividad transcripcional disminuyó con el incremento de la osmolaridad del medio de crecimiento bacteriano (figura V.23). En Na-LB, a partir de las 5 horas, la transcripción mostró niveles inferiores respecto de los medios LB y SLB durante el resto del tiempo analizado. Los niveles de actividad entre SLB y LB fueron

similares hasta las 10 horas de crecimiento. A partir de ese punto, en medio SLB hubo un incremento de la fluorescencia en función del tiempo alcanzando en su punto final valores 1,6 veces mayores respecto de LB, y 3,2 veces respecto de Na-LB.

Entre los mecanismos bacterianos de detección de osmolaridad mejor descritos, podemos mencionar al sistema de dos componentes EnvZ/OmpR, descrito por primera vez en *E. coli* como responsable de modular la expresión de porinas ante una señal hiperosmótica (366). Ante la hipótesis de que EnvZ/OmpR estuviera mediando el control transcripcional de *prtA*, se introdujo el plásmido reportero pPROBE::P_{prtA}-*gfp* en la cepa *ompR*, y se evaluó la actividad transcripcional del reportero en medio SLB, LB, y Na-LB. Los resultados obtenidos fueron similares a los de la cepa salvaje, indicando que, en *Sma*, OmpR no está involucrado en la modulación la expresión de *prtA* por variaciones en las condiciones de osmolaridad. Asimismo, se determinó que el sistema CpxRA tampoco interviene en esta modulación, debido a que los valores de fluorescencia observados para la cepa *cpxR*/pPROBE::P_{prtA}-*gfp* [ASV] variaron inversamente con la osmolaridad del medio de cultivo. Por lo tanto, se desconoce el sistema que media la represión de la expresión de *prtA* por aumento en la osmolaridad del medio de cultivo.

V.12. El hierro como señal moduladora de la expresión de la actividad proteolítica en *Serratia*

Una de las maneras en que un hospedador puede contrarrestar el desarrollo de infecciones bacterianas es mediante la privación a los patógenos invasores de aquellos nutrientes que son esenciales para su crecimiento, en un mecanismo normalmente conocido como “inmunidad nutricional” (367). Los microorganismos invasores dependen de fluidos nutricionalmente ricos del huésped que le proveen los componentes necesarios. En particular, el hierro juega un rol importante en este aspecto, siendo uno de los factores nutricionales limitantes para la multiplicación de las bacterias en el suero, saliva, lágrimas, leche y huevos. La gran mayoría del hierro en vertebrados es de localización intracelular, secuestrado dentro de la proteína ferritina o complejo en el anillo de porfirina del grupo hemo, como cofactor de la hemoglobina o la mioglobina. En este contexto, los patógenos bacterianos han evolucionado para detectar la carencia de hierro, y coordinar con éste la expresión de otros fenotipos requeridos para la infección. Típicamente, esta detección involucra primariamente el control transcripcional de genes cuyos productos contribuyen a contrarrestar el mecanismo de secuestro del metal por parte del hospedador: entre ellos, las citotoxinas producen daño celular que lleva a la liberación de ferritina;

mientras que las toxinas hemolíticas lisan eritrocitos, liberando hemoglobina. Posteriormente, los patógenos bacterianos luego captan estas fuentes de hierro mediante diversas estrategias como la síntesis de receptores para transferrina y lactoferrina, síntesis de receptores para hemoproteínas, y la síntesis y secreción de sideróforos, pequeñas moléculas capaces de competir con la transferrina y la lactoferrina por la unión al hierro (367).

En *Sma*, la actividad hemolítica depende de la disponibilidad de hierro (368). La síntesis de la hemolisina es reprimida por hierro, mientras que su depleción a través del quelante específico 2,2'-dipiridil produce un marcado aumento en los niveles hemolíticos. Por otra parte, en *Serratia proteamaculans*, se reportó que los niveles de actividad proteolítica secretada aumentan fuertemente en condiciones de depleción de hierro (en presencia de 2,2'-dipiridil). La presencia de este quelante en el medio de cultivo también duplicó la actividad invasiva de la bacteria (369).

Por consiguiente, se evaluó si la actividad proteolítica en *Sma* RM66262 se encuentra modulada por los niveles de hierro presente en el medio de cultivo. En primer lugar, se cuantificó la actividad proteasa al crecer a las bacterias en LB, con o sin agregado del compuesto 2,2'-dipiridil. Debido a que un exceso de dicho compuesto resulta detrimental para el crecimiento bacteriano, se determinó previamente que su concentración subinhibitoria máxima es de 150 μ M. En la figura V.24, se observa que los niveles de actividad proteasa secretada se incrementaron ante la depleción de hierro por agregado de 2,2'-dipiridil a ambas temperaturas ensayadas, obteniendo aumentos del 60% y 85% para 30°C y 37°C, respectivamente, en comparación con la condición control. En paralelo, la actividad proteolítica en medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos (carente de Fe en su composición) disminuyó tras la introducción de iones férricos al medio, en ambas temperaturas ensayadas.

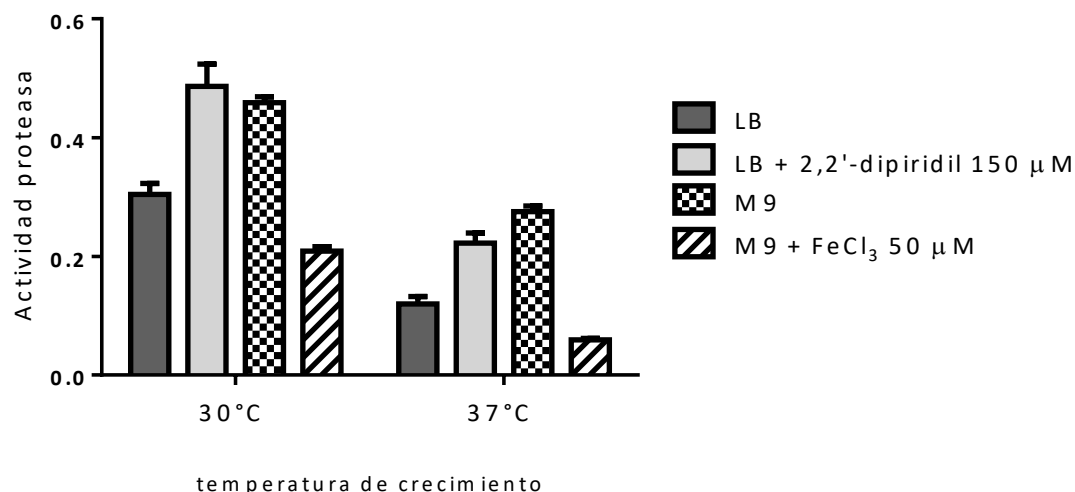


Figura V.24. Efecto de los niveles de hierro sobre la actividad proteolítica secretada. Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína, durante el crecimiento en medio líquido LB (con o sin agregado de 2,2'-dipiridil) o M9 (con o sin agregado de FeCl₃). Se indican los valores de actividad normalizados respecto de la cantidad de bacterias en el cultivo (Abs₃₄₀/DO₆₀₀). Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las bacterias fueron cultivadas a la temperatura indicada durante 16 horas.

Para determinar si la modulación por Fe sobre la actividad proteolítica secretada por *Sma* involucra modulación en la expresión de la serralisina PrtA, la cepa *prtA* se creció en LB con o sin agregado de 2,2'-dipiridil (figura V.25). Como se observa, la magnitud del incremento en la actividad proteolítica al agregar el quelante de Fe fue similar al observado para la cepa salvaje, lo que sugiere que la regulación por hierro sobre la actividad proteolítica no afecta a PrtA. Al evaluar la cepa *lipB*, se observó que los niveles de actividad proteolítica no variaron ante la depleción de hierro. Estos resultados sugieren que la modulación de la actividad proteolítica por hierro dependería de una o más proteasas cuya secreción está mediada por el sistema Lip.

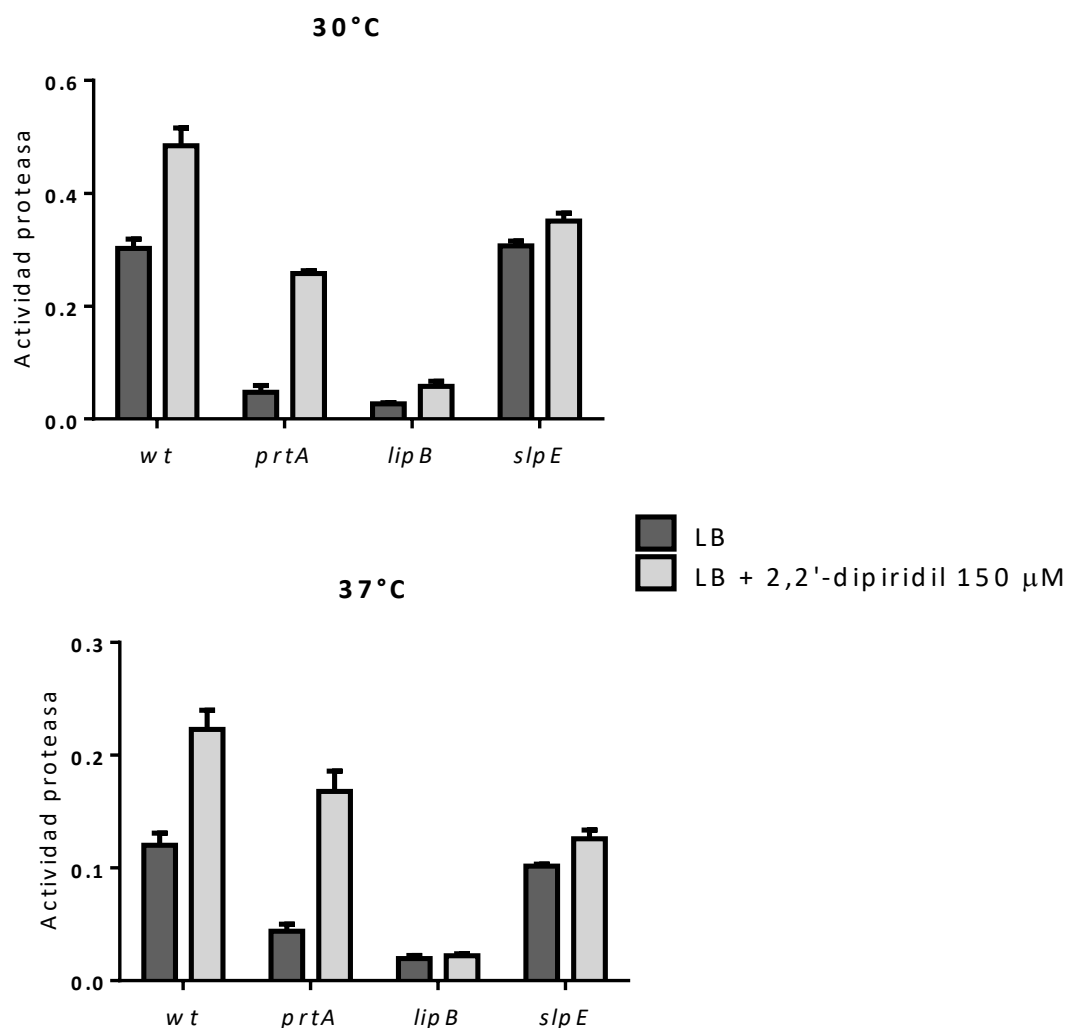


Figura V.25. Actividad proteolítica secretada en condiciones de depleción de hierro en las cepas *wt*, *prtA*, *lipB* y *slpE*. Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína, durante el crecimiento en medio líquido LB (con o sin agregado de 2,2'-dipiridil). Se indican los valores de actividad proteasa normalizados respecto de la cantidad de bacterias en el cultivo ($\text{Abs}_{340}/\text{DO}_{600}$). Se representan los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Las bacterias fueron cultivadas a la temperatura indicada durante 16 horas.

Recapitulando los resultados presentados en la primera sección del presente capítulo, *Sma* RM66262 codifica –además de *PrtA*– otras tres metaloproteasas más: *SlpC*, *SlpD*, y *SlpE*. De entre éstas, *SlpE* es la que posee mayor homología con *PrtA*, y ambas presentan en su dominio C-terminal cuatro motivos RTX, que han sido reportados como componentes relevantes para el reconocimiento y la secreción por los SSTI (356). Entonces, conjeturamos que *SlpE* podría utilizar el mismo sistema de translocación que *PrtA*, es decir, el SSTI Lip. Se construyó la cepa *slpE*, interrumpiendo dicho gen mediante inserción sitio dirigida de pKNOCK-Cm (sección III.8.1). En placas LB-agar-leche esta mutante presentó una modesta reducción del halo respecto a la cepa salvaje, sólo cuando la cepa fue crecida a 37°C (figura V.26).

En concordancia, en medio líquido LB a 37°C, *slpE* mostró 15% menos de actividad proteolítica respecto a la cepa salvaje. De este modo, en medio LB, SlpE se expresaría preferentemente a los 37°C de temperatura de crecimiento, una modulación contraria a la descrita en esta Tesis para PrtA. Más importante aún, el agregado del compuesto 2,2'-dipiridil al medio LB provocó un escaso incremento de los niveles proteolíticos secretados por la cepa *slpE*, a ambas temperaturas ensayadas (figura V.25). Este resultado indica que la regulación por hierro de la actividad proteolítica observada para la cepa salvaje está ejercida mayoritariamente sobre SlpE.

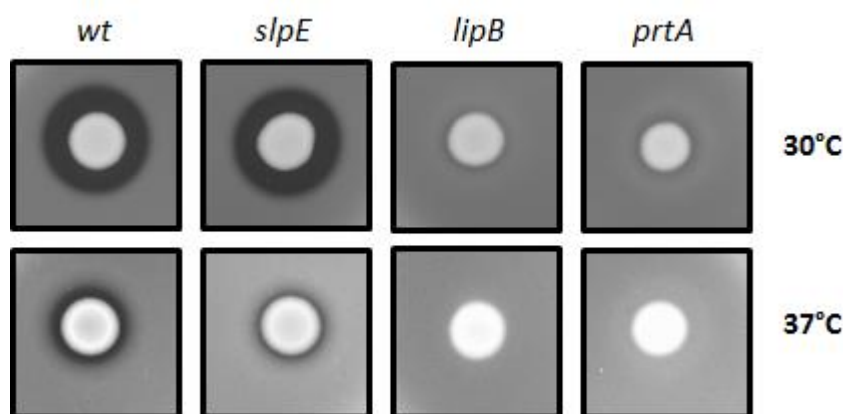
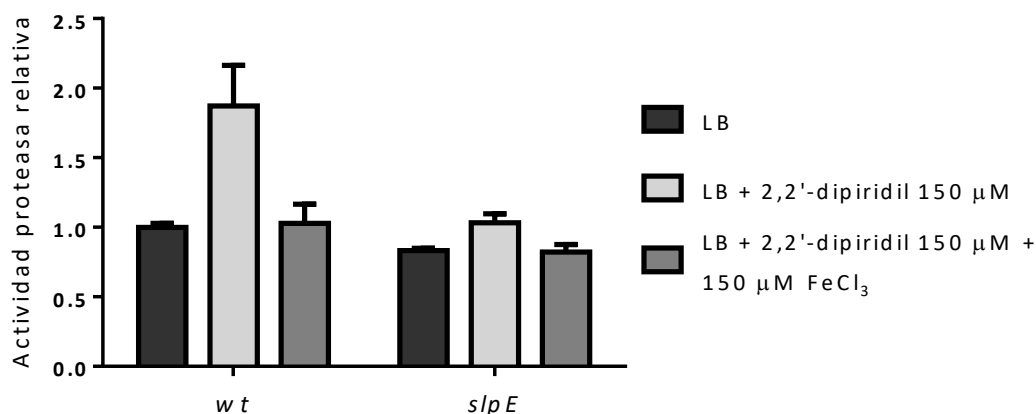


Figura V.26. Actividad proteolítica secretada en placa de la cepa *slpE*. Se muestran además las cepas *wt*, *lipB* y *prtA* como control. Las bacterias fueron crecidas 24 horas a la temperatura indicada.

Para corroborar que los niveles hierro en el medio de cultivo constituyen la señal responsable de esta modulación, se adicionó FeCl_3 en una concentración equimolar al quelante (150 μM) y se evaluó si se restauraban los niveles proteolíticos a los valores presentados durante el crecimiento en LB a 37°C. Como se muestra en la figura V.27.A, en la cepa salvaje se observó restauración del fenotipo. En paralelo, se analizaron los perfiles proteicos de los extractos extracelulares en las tres condiciones de cultivo utilizadas. Como se indica en la parte B de la figura, la cepa *wt* presentó una banda proteica de expresión abundante al crecer las bacterias en medio LB con agregado de 2,2'-dipiridil. Dicha banda migró por debajo de los 55 kDa, coincidiendo con el peso molecular teórico de SlpE. Si bien, al analizar el perfil de la cepa *slpE*, se detecta una segunda banda que co-migra a la misma altura que SlpE, su expresión no varía en presencia de 2,2'-dipiridil, indicando que es SlpE la proteína cuya expresión está modulada por presencia de Fe en el medio de cultivo. Por otra parte, PrtA también es más abundante en presencia de 2,2'-dipiridil; fenómeno que se revierte al agregar iones férricos al medio. Esto sugiere que la inducción remanente de actividad

proteolítica en la cepa *slpE* en presencia del quelante (estimada en un 24,5%, a partir de la figura V.25) sería causada por una modulación de menor magnitud sobre PrtA.

A



B

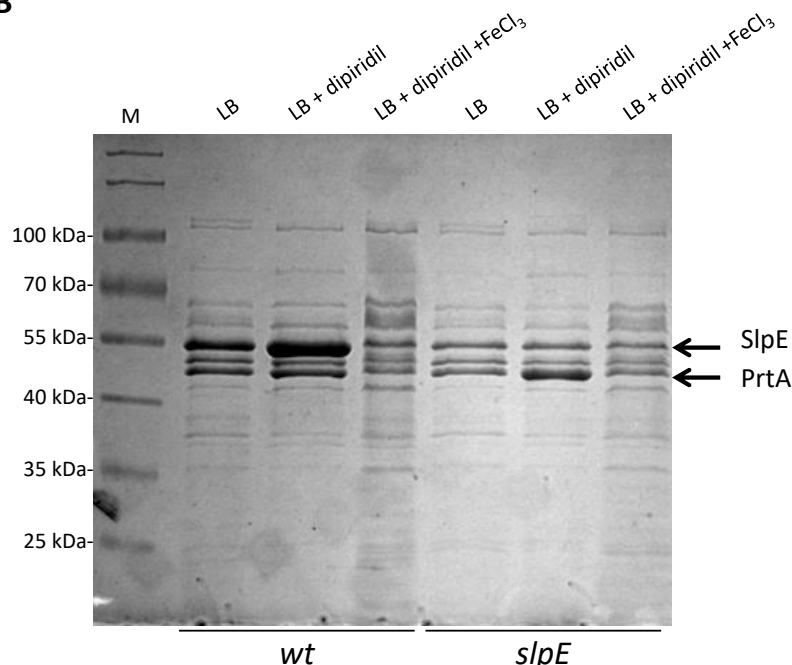


Figura V.27. A) Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Se indican los valores de actividad en relación a los valores obtenidos para la cepa salvaje crecida en LB. Se representan los promedios y desviaciones estándar de dos experimentos independientes. **B)** SDS-PAGE de extractos extracelulares. En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 16 horas, en medio líquido LB con o sin agregado de 2,2'-dipiridil y FeCl_3 , según se indique.

La modulación positiva de estas metaloproteasas durante el crecimiento en condiciones limitantes de hierro puede ser de relevancia durante el proceso patogénico de *Serratia*. Conjeturamos que si SlpE posee una actividad citotóxica similar a la descrita para PrtA, la misma podría provocar daños celulares que contribuyan a la liberación de fuentes de hierro, contrarrestando de este modo los mecanismos de secuestro del metal normalmente desplegados por el hospedador.

El regulador maestro de la homeostásis de hierro –tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas- es el factor transcripcional de unión a hierro Fur (*Ferric Uptake Regulator*). Fur es una proteína de unos 15-17 kDa, capaz de formar dímeros en presencia de hierro (y otros cationes divalentes), los que se unen al ADN y modulan la transcripción de los genes blanco (370). Con el objeto de determinar si la inducción de la actividad proteolítica observada en medios con carencia de hierro es dependiente de Fur, se construyó una mutante insercional en dicho gen (metodología descrita en la sección III.8.1), y se evaluó la hidrólisis de azocaseína a partir de sobrenadantes de cultivos bacterianos crecidos con o sin presencia de 2,2'-dipiridil.

En la figura V.28 observamos que la cepa salvaje duplicó los niveles cuantificados de proteólisis ante la depleción de hierro, respecto del crecimiento en LB; mientras la cepa *fur* no presentó cambios significativos entre estas dos condiciones de crecimiento. Por ende, se sugiere que Fur se encontraría involucrado en la activación de *slpE* en condiciones limitantes de hierro.

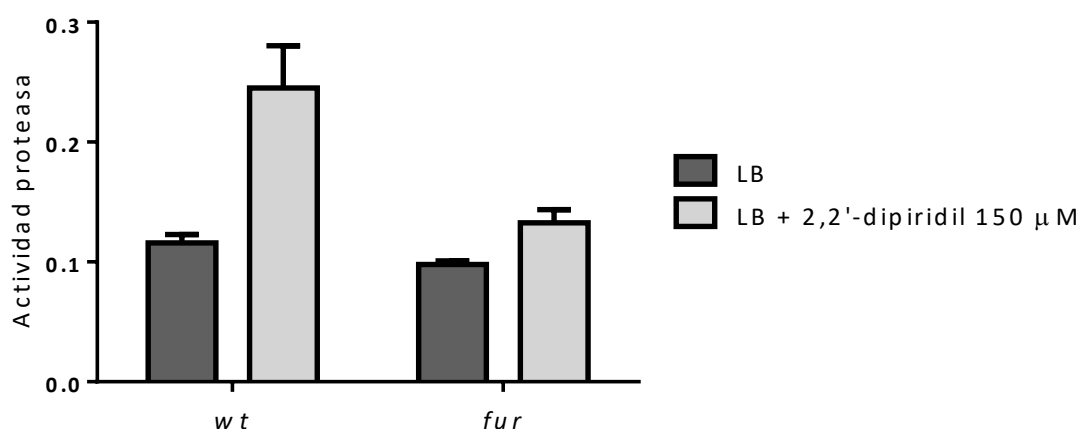


Figura V.28. El aumento de la actividad proteolítica secretada ante la carencia de Fe es dependiente de Fur. Actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo cuantificada por degradación de azocaseína. Las bacterias fueron cultivadas a 37°C durante 16 horas en medio LB con o sin agregado de 2,2'-dipiridil. Se indican los valores de actividad proteasa normalizados respecto de la cantidad de bacterias en el cultivo (Abs_{340}/DO_{600}). Se representan los promedios y desviaciones estándar de dos experimentos independientes.

Clásicamente, Fur ha sido descrito como un factor represor: en condiciones de abundancia de hierro, el complejo Fur-Fe se une a un elemento regulatorio en *cis* de un determinado gen, previniendo la unión de la ARN polimerasa sobre la región promotora, y bloqueando su transcripción. Más recientemente, estudios sobre los mecanismos regulatorios de Fur han postulado modelos donde el regulador es capaz de actuar como un activador transcripcional mediante su unión -en condiciones

limitantes de hierro- a elementos en *cis* proximales al sitio de unión de la ARN polimerasa, facilitando el reclutamiento de la misma sobre los promotores de los genes blanco (370). Por lo tanto, en nuestro caso, Fur estaría cumpliendo este rol como activador transcripcional. Para corroborar estos resultados, queda pendiente el análisis de la expresión -en condiciones de crecimiento ricas o carentes de hierro- de *slpE* en un entorno *fur*, tanto a nivel de su transcripto como a nivel proteico. Asimismo, para confirmar la regulación directa de Fur sobre *slpE*, se podrían realizar ensayos de retardo de la movilidad electroforética del ADN, utilizando el fragmento de ADN correspondiente a la región promotora de *slpE* y la proteína purificada Fur.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este segundo capítulo permiten formular las siguientes conclusiones:

- A través de un análisis *in silico* sobre el genoma de *Sma* RM66262, se identificaron tres genes codificantes de proteínas con alta homología a la serralisina PrtA: *slpC*, *slpD*, y *slpE*. A través de ensayos de RT-PCR, se determinó que estos cuatro genes se expresan en las condiciones de crecimiento ensayadas.
- La serralisina PrtA, translocada al espacio extracelular por el SSTI LipBCD, es responsable por la mayor parte de la actividad proteolítica detectada en los sobrenadantes de cultivo de *Sma* RM66262.
- La adición de los epítopes 3xFLAG y 6xHis al extremo C-terminal de la serralisina PrtA afectó los niveles de secreción de dicha enzima, probablemente debido a la alteración del motivo C-terminal reconocido por el sistema LipBCD.
- La expresión de PrtA se encuentra modulada a nivel transcripcional por la fase y la temperatura de crecimiento bacteriano. La actividad proteolítica detectada fue máxima en fase estacionaria de crecimiento, a 25°C.
- El sistema de dos componentes CpxRA regula de manera negativa la transcripción de *prtA* a 37°C. Estudios de expresión por RT-qPCR sobre otros miembros del regulón Cpx sugirieron que, en *Serratia*, el sistema se encuentra preferencialmente activo a 37°C.
- La sobreexpresión de la lipoproteína de membrana externa NlpE provocó una drástica disminución en la actividad proteolítica secretada, de manera dependiente de CpxRA, lo que refuerza el rol represor de dicho sistema sobre la expresión de PrtA y probablemente también sobre otras proteasas secretadas de *Sma*.
- El crecimiento a pH ácido –descrito como señal no inductora del sistema CpxRA– anula las diferencias de actividad proteolítica detectadas entre las cepas salvaje y *cpxR*. Sin embargo, en esta condición de crecimiento, se observó un incremento de dichas actividades en comparación con el crecimiento a pH alcalino, de manera independiente de CpxRA.

- Condiciones de alta osmolaridad del medio de cultivo reprimen a nivel transcripcional la expresión de PrtA. Los componentes y mecanismos de detección y transducción de esta señal permanecen sin identificar.
- SlpE es el blanco principal de la regulación por Fe, dependiente de Fur, de la actividad proteolítica secretada de *Serratia*. Se demostró indirectamente que SlpE es un nuevo componente del secretoma LipBCD.

VI. RESUMEN

Serratia marcescens es un patógeno oportunista de humanos con una incidencia creciente en infecciones nosocomiales, y ha sido identificado como la causa de brotes fatales en unidades de terapia intensiva y neonatales. Una característica relevante de *Sma* es la producción de numerosas exoproteínas y vesículas de membrana externa (OMVs) que han sido relacionadas con la virulencia de este patógeno. Sin embargo, es escaso el conocimiento que se tiene sobre cómo estos factores contribuyen a la capacidad patogénica de la bacteria, y sobre las estrategias regulatorias que rigen su expresión.

Trabajos anteriores realizados por un grupo colaborador con nuestro laboratorio se focalizaron en el contenido proteico de las OMVs de *Sma* y demostraron su toxicidad frente a la polilla de la cera *Galleria mellonella*, sin identificar los factores responsables de dicho fenotipo. En el presente trabajo, se amplió el conocimiento sobre la bioquímica y el rol patogénico de las OMVs. En primer lugar, a través de un método de purificación optimizado de vesículas, se re-evaluó el proteoma de las vesículas, identificando una serie de potenciales factores de virulencia asociados. La comparación entre este proteoma y el perteneciente a membrana externa, reveló la presencia de componentes selectivamente seleccionados/excluidos entre estos compartimentos. Entre estos factores, la serralisina PrtA se encontró asociada a OMVs. Tras la co-incubación de OMVs con células epiteliales en cultivo, se detectó la presencia de vesículas dentro de las células, sugiriendo que las mismas son capaces de internalizarse en células del hospedador. Asimismo, altas concentraciones de OMVs resultaron tóxicas frente a estas células de una manera PrtA dependiente. La utilización del modelo *in vivo* *Drosophila melanogaster* corroboró la toxicidad causada por PrtA en las vesículas, cuando estas se introdujeron directamente en la hemolinfa de los insectos. Se demostró que las OMVs interaccionan con el sistema inmune innato de *Drosophila*, disparando la señalización mediada por las vías Imd y Toll, las cuales son necesarias para proveer protección frente a las OMVs. Complementariamente, se obtuvieron evidencias acerca de que las OMVs –mediante la acción de PrtA– alteran la respuesta sistémica a la herida redox dependiente, transformando un mecanismo descrito como protector en detrimental para la supervivencia de los insectos.

En una segunda parte del trabajo, teniendo en cuenta la relevancia de la metaloproteasa PrtA como factor de virulencia, nos abocamos a la identificación de las señales y mecanismos regulatorios que modulan su expresión. Se determinó que su expresión se encuentra fuertemente modulada a nivel transcripcional por la fase y la temperatura de crecimiento bacteriano. En la búsqueda de factores regulatorios que modulen la expresión de esta enzima, se determinó que el sistema CpxRA regula de manera negativa la transcripción de *prtA* a 37°C, mediante la unión de CpxR a una secuencia consenso en la región promotora de *prtA*. Por otro lado, se identificaron en nuestro aislamiento de *Sma* otros tres genes codificantes de proteínas con alta homología a PrtA: *slpC*, *slpD*, y *slpE*. Se determinó que SlpE es un nuevo componente del secretoma LipBCD, y además es el blanco principal de la regulación por hierro, dependiente del regulador Fur, de la actividad proteolítica secretada de *Serratia*.

En suma, los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral, mostraron que las OMVs son relevantes para el proceso patogénico de *Serratia*: causan toxicidad en células CHO y letalidad en *Drosophila melanogaster*, e interaccionan e interfieren con mecanismos de respuesta inmune del insecto. PrtA es el factor de virulencia principal asociado a las OMVs, responsable mayoritario de los fenotipos observados. Se demostró que PrtA es parte del regulón Cpx en *Serratia*, actuando CpxR como factor represor de *prtA* a 37°C.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Grimont F, Grimont PAD.** 2006. The Genus *Serratia* 219–244.
2. **Mahlen SD.** 2011. *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev* **24**:755–791.
3. **Hejazi A, Falkiner FR, Microbiology C, College T, Patrick S, James S.** 1997. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* **46**:903–12.
4. **Grimont F, Grimont P.** 1978. The Genus *Serratia*. *Annu Rev Microbiol* **32**:221–48.
5. **Merlino CP.** 1924. Bartolomeo Bizio's Letter to the most Eminent Priest, Angelo Bellani, Concerning the Phenomenon of the Red Colored Polenta. *J Bacteriol* **9**:527–43.
6. **Sehdev PS, Donnenberg MS.** 1999. Arcanum: The 19th-century Italian pharmacist pictured here was the first to characterize what are now known to be bacteria of the genus *Serratia*. *Clin Infect Dis* **29**:770, 925.
7. **Bennett JW, Bentley R.** 2000. Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv Appl Microbiol* **47**:1–32.
8. **Guentzel MN.** 1996. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, and *Proteus* Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston.
9. **Schwab F, Geffers C, Piening B, Haller S, Eckmanns T, Gastmeier P.** 2014. How many outbreaks of nosocomial infections occur in German neonatal intensive care units annually? *Infection* **42**:73–8.
10. **Kramer A, Schwebke I, Kampf G.** 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* **6**:130.
11. **Yu VL.** 1979. *Serratia marcescens*: historical perspective and clinical review. *N Engl J Med* **300**:887–93.
12. **Marre R, Hacker J, Braun V.** 1989. The cell-bound hemolysin of *Serratia marcescens* contributes to uropathogenicity. *Microb Pathog* **7**:153–156.
13. **Albers MJJJ, Mouton JW, Tibboel D.** 2001. Colonization and infection by *Serratia* species in a paediatric surgical intensive care unit. *J Hosp Infect* **48**:7–12.
14. **Egebo K, Toft P, Jakobsen CJ.** 1996. Contamination of central venous catheters. The skin insertion wound is a major source of contamination. *J Hosp Infect* **32**:99–104.
15. **Chaudhuri AK, Booth CF.** 1992. Outbreak of chest infections with *Serratia marcescens*. *J Hosp Infect* **22**:169–70.
16. **Riberi A, Caus T, Mesana T, Goudard A, Mouly A, Habib G, Monties JR.** 1997. Aortic valve or root replacement with cryopreserved homograft for active infectious endocarditis. *Cardiovasc Surg* **5**:579–583.
17. **Hume EB, Willcox MD, Sweeney DF, Holden BA.** 1996. An examination of the clonal variants of *Serratia marcescens* that infect the eye during contact lens wear. *J Med Microbiol* **45**:127–32.

18. **Hertle R, Schwarz H.** 2004. *Serratia marcescens* internalization and replication in human bladder epithelial cells. *BMC Infect Dis* **4**:16.
19. **Krzyminińska S, Ochocka K, Kaznowski A.** 2012. Apoptosis of epithelial cells and macrophages due to nonpigmented *Serratia marcescens* strains. *ScientificWorldJournal* **2012**:679639.
20. **Colombo I, Fedrigo G V, Campoy EM, Venanzio G Di.** 2011. *Serratia marcescens* Is Able to Survive and Proliferate in Autophagic-Like Vacuoles inside Non-Phagocytic Cells **6**.
21. **Di Venanzio G, Stepanenko TM, García Véscovi E.** 2014. *Serratia marcescens* ShlA pore-forming toxin is responsible for early induction of autophagy in host cells and is transcriptionally regulated by RcsB. *Infect Immun* **82**:3542–54.
22. **Barchiesi J, Castelli ME, Di G, Colombo MI, García E.** 2012. The PhoP/PhoQ System and Its Role in *Serratia marcescens* Pathogenesis.
23. **Di Venanzio G, Lazzaro M, Morales ES, Krapf D, García Véscovi E.** 2016. A pore-forming toxin enables *Serratia* a non-lytic egress from host cells. *Cell Microbiol* **4237070**.
24. **Kurz Â, Chauvet S, Le C, Aurouze M, Vallet I, Bentzmann S De, Steinmetz I, Hoffmann JA, Finlay BB, Gorvel J, Ferrandon D, Ewbank JJ.** 2003. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identi® ed by in vivo screening **22**:1451–1460.
25. **Nehme NT, Liégeois S, Kele B, Giammarinaro P, Pradel E, Hoffmann J a, Ewbank JJ, Ferrandon D.** 2007. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* **3**:e173.
26. **Diacovich L, Gorvel J-P.** 2010. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. *Nat Rev Microbiol* **8**:117–28.
27. **Williamson NR, Simonsen HT, Ahmed RAA, Goldet G, Slater H, Woodley L, Leeper FJ, Salmond GPC.** 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyI-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Mol Microbiol* **56**:971–89.
28. **Stock I, Grueger T, Wiedemann B.** 2003. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens sensu stricto*, *S. proteamaculans* and *S. grimesii*. *Int J Antimicrob Agents* **22**:35–47.
29. **Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, Labia R, Sirot J.** 2000. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:3061–8.
30. **Nastro M, Monge R, Zintgraff J, Vaulet LG, Boutureira M, Famiglietti A, Rodriguez CH.** 2013. First nosocomial outbreak of VIM-16-producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect* **19**:617–619.
31. **Joris B, De Meester F, Galleni M, Masson S, Dusart J, Frère J-M, Van Beeumen J, Bush K, Sykes R.** 1986. Properties of a class C beta-lactamase from *Serratia marcescens*. *Biochem J* **239**:581–586.
32. **García DC, Woloj GM, Piñeiro S, Sordelli DO, Kaufman S.** 1995. An 8-year study of resistance to amikacin in gram-negative bacilli isolates from patients with nosocomial

- infection at one hospital in Argentina. *J Med Microbiol* **42**:283–90.
33. **Kim C, Heseck D, Zajíček J, Vakulenko SB, Mobashery S.** 2006. Characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme ANT(3'')-II/AAC(6')-IId from *Serratia marcescens*. *Biochemistry* **45**:8368–77.
34. **Berlanga M, Vázquez JL, Hernandez-Borrell J, Montero MT, Viñas M.** 2000. Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens*. *Microb Drug Resist* **6**:111–7.
35. **Kumar A, Worobec EA.** 2002. Fluoroquinolone resistance of *Serratia marcescens*: involvement of a proton gradient-dependent efflux pump. *J Antimicrob Chemother* **50**:593–596.
36. **Weigel LM, Steward CD, Tenover FC.** 1998. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:2661–2667.
37. **Whitehead NA, Barnard AML, Slater H, Simpson NJL, Salmond GPC.** 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**:365–404.
38. **Eberl L, Winson MK, Sternberg C, Stewart GSAB, Christiansen G, Chhabra SR, Bycroft B, Williams P, Molin S, Givskov M.** 1996. Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behaviour of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol* **20**:127–136.
39. **Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S.** 2004. Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **186**:692–698.
40. **Rice S a, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, Kjelleberg S.** 2005. Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *J Bacteriol* **187**:3477–3485.
41. **Riedel K, Ohnesorg T, Krogfelt KA, Hansen TS, Omori K, Givskov M, Eberl L.** 2001. N-acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **183**:1805–1809.
42. **Hornig YT, Deng SC, Daykin M, Soo PC, Wei JR, Luh KT, Ho SW, Swift S, Lai HC, Williams P.** 2002. The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* **45**:1655–1671.
43. **Winzer K, Hardie KR, Williams P.** 2003. LuxS and Autoinducer-2: Their Contribution to Quorum Sensing and Metabolism in Bacteria. *Adv Appl Microbiol* **53**:291–396.
44. **Coulthurst SJ, Kurz CL, Salmond GPC.** 2004. *luxS* mutants of *Serratia* defective in autoinducer-2-dependent “quorum sensing” show strain-dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology* **150**:1901–1910.
45. **Macnab RM.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**:77–100.
46. **Anderson JK, Smith TG, Hoover TR.** 2010. Sense and sensibility : flagellum- mediated gene regulation. *Trends Microbiol* **18**:1–17.
47. **Patrick JE, Kearns DB.** 2012. Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol Microbiol* **83**:14–23.

48. **Castelli ME, Ve EG.** 2011. The Rcs Signal Transduction Pathway Is Triggered by Enterobacterial Common Antigen Structure Alterations in *Serratia marcescens* □ **193**:63–74.
49. **Eberl L, Christlansen G, Molin S, Givskov M.** 1996. Differentiation of *Serratia liquefaciens* into swarm cells is controlled by the expression of the *flhD* master operon. *J Bacteriol* **178**:554–559.
50. **Alberti L, Harshey RM.** 1990. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells. *J Bacteriol* **172**:4322–4328.
51. **Eberl L, Molin S, Givskov M.** 1999. Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* **181**:1703–1712.
52. **Lai HC, Soo PC, Wei JR, Yi WC, Liaw SJ, Horng YT, Lin SM, Ho SW, Swift S, Williams P, Ateriol JB.** 2005. The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J Bacteriol* **187**:3407–3414.
53. **Matsuyama T, Murakami T, Fujita M, Fujita S, Yano I.** 1986. Extracellular Vesicle Formation and Biosurfactant Production by *Serratia marcescens*. *Microbiology* **132**:865–875.
54. **Molin JB, Givskov M, Lindum PW, Anthoni U, Christophersen C, Eberl L.** 1998. N-Acyl-L-Homoserine Lactone Autoinducers Control Production of an Extracellular Lipopeptide Biosurfactant Required for Swarming Motility of *Serratia liquefaciens* MG1 **180**:6384–6388.
55. **Donlan RM, Costerton JW, Donlan RM, Costerton JW.** 2002. Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol* **15**:167–193.
56. **Shanks RMQ, Stella N a., Hunt KM, Brothers KM, Zhang L, Thibodeau PH.** 2015. Identification of SlpB, a Cytotoxic Protease from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* **83**:2907–2916.
57. **Akatsuka H, Kawai E, Omori K, Shibatani T.** 1995. The three genes lipB, lipC, and lipD involved in the extracellular secretion of the *Serratia marcescens* lipase which lacks an N-terminal signal peptide. *J Bacteriol* **177**:6381–9.
58. **Omori K, Idei A, Akatsuka H.** 2001. *Serratia* ATP-binding Cassette Protein Exporter, Lip, Recognizes a Protein Region Upstream of the C Terminus for Specific Secretion. *J Biol Chem* **276**:27111–27119.
59. **Arpigny JL, JAEGER K-EE.** 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**:177–183.
60. **Akatsuka H, Kawai E, Omori K, Komatsubara S, Shibatani T, Tosa T.** 1994. The lipA gene of *Serratia marcescens* which encodes an extracellular lipase having no N-terminal signal peptide. *J Bacteriol* **176**:1949–1956.
61. **Angkawidjaja C, Kanaya S.** 2006. Family I.3 lipase: Bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell Mol Life Sci* **63**:2804–2817.
62. **Kawai E, Akatsuka H, Idei A, Shibatani T, Omori K.** 1998. *Serratia marcescens* S-layer protein is secreted extracellularly via an ATP-binding cassette exporter, the Lip system. *Mol Microbiol* **27**:941–952.

63. **Dubreuil JD, Kostrzynska M, Austin JW, Trust TJ.** 1990. Antigenic Differences among *Campylobacter*-Fetus S-Layer Proteins. *J Bacteriol* **172**:5035–5043.
64. **Miyoshi S, Shinoda S.** 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**:91–98.
65. **Baumann U.** 1994. Crystal Structure of the 50 kDa Metalloprotease from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol*.
66. **Tallant C, Marrero A, Gomis-Rüth FX.** 2010. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. *Biochim Biophys Acta* **1803**:20–8.
67. **Linhartová I, Bumba L, Mašín J, Basler M, Osička R, Kamanová J, Procházková K, Adkins I, Hejnová-Holubová J, Sadílková L, Morová J, Sebo P.** 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* **34**:1076–112.
68. **Zhang L, Conway JF, Thibodeau PH.** 2012. Calcium-induced Folding and Stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease. *J Biol Chem* **287**:4311–4322.
69. **Matsubara H.** 1986. Cloning and sequencing of *Serratia* protease gene. *Nucleic Acids Res* **14**:5843–5855.
70. **Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C.** 1989. Characterization of a protein inhibitor of extracellular proteases produced by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **3**:79–86.
71. **Feltzer RE, Gray RD, Dean WL, Pierce WM.** 2000. Alkaline proteinase inhibitor of *pseudomonas aeruginosa*: Interaction of native and N-terminally truncated inhibitor proteins with *pseudomonas* metalloproteinases. *J Biol Chem* **275**:21002–21009.
72. **Baumann U, Bauer M, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C.** 1995. Crystal structure of a complex between *Serratia marcescens* metallo-protease and an inhibitor from *Erwinia chrysanthemi*. *J Mol Biol* **248**:653–61.
73. **Hege T, Feltzer RE, Gray RD, Baumann U.** 2001. Crystal structure of a complex between *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and its cognate inhibitor: Inhibition by a zinc-NH₂ coordinative bond. *J Biol Chem* **276**:35087–35092.
74. **Molla A, Matsumoto K, Oyamada I, Katsuki T, Maeda H.** 1986. Degradation of Protease Inhibitors, Immunoglobulins, and Other Serum Proteins by *Serratia* Protease and Its Toxicity to Fibroblasts in Culture. *Infect Immun* **53**:522–529.
75. **Marty KB, Williams CL, Guynn LJ, Benedik MJ, Blanke SR.** 2002. Characterization of a Cytotoxic Factor in Culture Filtrates of *Serratia marcescens* **70**:1121–1128.
76. **Shanks RMQ, Stella N a., Hunt KM, Brothers KM, Zhang L, Thibodeau PH.** 2015. Identification of SlpB, a cytotoxic protease from *Serratia marcescens*. *Infect Immun* **83**:IAI.03096–14.
77. **Kida Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K.** 2007. *Serratia marcescens* serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect Immun* **75**:164–74.
78. **Matsumoto K.** 2004. Role of bacterial proteases in *pseudomonas* and *serratia* keratitis. *Biol Chem* **385**:1007–1016.
79. **Molla A, Oda T, Maeda H.** 1987. Different Binding Kinetics of *Serratia* 56K Protease with Plasma and Chicken Egg White Ovomacroglobulin. *J Biochem* **101**:199–205.

80. **Butterworth MB, Zhang L, Liu X, Shanks RM, Thibodeau PH.** 2014. Modulation of the epithelial sodium channel (ENaC) by bacterial metalloproteases and protease inhibitors. *PLoS One* **9**:e100313.
81. **Ishii K, Adachi T, Hamamoto H, Sekimizu K.** 2014. *Serratia marcescens* suppresses host cellular immunity via the production of an adhesion-inhibitory factor against immunosurveillance cells. *J Biol Chem* **289**:5876–88.
82. **Ishii K, Adachi T, Hara T, Hamamoto H, Sekimizu K.** 2014. Identification of a *Serratia marcescens* virulence factor that promotes hemolymph bleeding in the silkworm, *Bombyx mori*. *J Invertebr Pathol* **117**:61–7.
83. **Shibuya Y, Okabe H.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase might share a biological function with plasmin. - PubMed - NCBI. *Biochim Biophys Acta* **1077**:316–324.
84. **Fetzer A, Werner A, Hagstrom JW.** 1967. Pathologic features of pseudomonal pneumonia. *Am Rev Respir Dis* **96**:1121–30.
85. **Heck L, Morihara K, Abrahamson D.** 1986. Degradation of Soluble Laminin and Depletion of Tissue-Associated Basement Membrane Laminin by *Pseudomonas aeruginosa* Elastase and Alkaline Protease. *Infect Immun* **54**:149–153.
86. **Hong Y, Ghebrehiwet B.** 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* **62**:133–138.
87. **Wassif C, Cheek D, Belas R.** 1995. Molecular analysis of a metalloprotease from *Proteus mirabilis*. *J Bacteriol* **177**:5790–8.
88. **Loomes LM, Kerr MA, Senior BW.** 1993. The cleavage of immunoglobulin G in vitro and in vivo by a proteinase secreted by the urinary tract pathogen *Proteus mobilis*. *J Med Microbiol* **39**:225–232.
89. **Belas R, Manos J, Suvanasuthi R.** 2004. *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates , Including Antimicrobial Peptides *Proteus mirabilis* ZapA Metalloprotease Degrades a Broad Spectrum of Substrates , Including Antimicrobial Peptides †. *Infect Immun* **72**:5159–5167.
90. **Walker KE, Moghaddame-Jafari S, Lockatell CV, Johnson D, Belas R.** 1999. ZapA, the IgA-degrading metalloprotease of *Proteus mirabilis*, is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells. *Mol Microbiol* **32**:825–836.
91. **Schiebel E, Schwarz H, Braun V.** 1989. Subcellular location and unique secretion of the hemolysin of *Serratia marcescens*. *J Biol Chem* **264**:16311–16320.
92. **Petersen LM, Tisa LS.** 2013. Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Can J Microbiol* **59**:627–40.
93. **Hertle R, Brutsche S, Groeger W, Hobbie S, Koch W, Könninger U, Braun V.** 1997. Specific phosphatidylethanolamine dependence of *Serratia marcescens* cytotoxin activity. *Mol Microbiol* **26**:853–65.
94. **Hertle R.** 2000. *Serratia* type pore forming toxins. *Curr Protein Pept Sci* **1**:75–89.
95. **Hertle R, Hilger M, Weingardt-kocher S.** 1999. Cytotoxic Action of *Serratia marcescens* Hemolysin on Human Epithelial Cells Cytotoxic Action of *Serratia*

- marcescens Hemolysin on Human Epithelial Cells. *Am Soc Microbiol* **67**:817–825.
96. **Yanagida N, Uozumi T, Beppu T.** 1986. protease through the outer membrane of Specific Excretion of *Serratia marcescens* Protease through the Outer Membrane of *Escherichia coli* **166**:937–944.
97. **Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S.** 1997. Two genes encoding serine protease homologues in *Serratia marcescens* and characterization of their products in *Escherichia coli*. *J Biochem* **121**:902–13.
98. **Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VG.** 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *TL - 142 (Pt 7). Microbiology* **142 (Pt 7)**:1581–1589.
99. **Tews I, Vincentelli R, Vorgias CE.** 1996. N-acetylglucosaminidase (chitobiase) from *Serratia marcescens*: Gene sequence, and protein production and purification in *Escherichia coli*. *Gene* **170**:63–67.
100. **Orikoshi H, Nakayama S, Miyamoto K, Hanato C, Yasuda M, Inamori Y, Tsujibo H.** 2005. Roles of four chitinases (ChiA, ChiB, ChiC, and ChiD) in the chitin degradation system of marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* **71**:1811–1815.
101. **Givskov M, Molin S.** 1992. Expression of extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens* is growth-phase-dependent, catabolite-repressed and regulated by anaerobiosis. *Mol Microbiol* **6**:1363–1374.
102. **Givskov M, Eberl L, Christiansen G, Benedik MJ, Molin S.** 1995. Induction of phospholipase- and flagellar synthesis in *Serratia liquefaciens* is controlled by expression of the flagellar master operon *flhD*. *Mol Microbiol* **15**:445–454.
103. **Shimuta K, Ohnishi M, Iyoda S, Gotoh N, Koizumi N, Watanabe H.** 2009. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhIA) depend on lysophospholipid production by PhIA. *BMC Microbiol* **9**:261.
104. **Eaves GE, Jefferies CD.** 1963. Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia Marcescens*. *J Bacteriol* **85**:273–278.
105. **Benedik MJ, Strych U.** 1998. *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiol Lett* **165**:1–13.
106. **Ellis TN, Kuehn MJ.** 2010. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **74**:81–94.
107. **Mashbrun-Warren, McLean, Whiteley.** 2011. Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* **6**:214–219.
108. **Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL.** 2015. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol* **15**:375–387.
109. **Pathirana R, Kaparakis-Liaskos M.** 2016. Bacterial membrane vesicles: biogenesis, immune regulation and pathogenesis. *Cell Microbiol* **1–12**.
110. **Park JS, Lee WC, Yeo KJ, Ryu K-S, Kumarasiri M, Hesek D, Lee M, Mobashery S, Song JH, Kim SI, Lee JC, Cheong C, Jeon YH, Kim H-Y.** 2012. Mechanism of anchoring of OmpA protein to the cell wall peptidoglycan of the gram-negative bacterial outer membrane. *FASEB J* **26**:219–228.

111. **Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U.** 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: Multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* **136**:280–285.
112. **Deatherage BL, Lara JC, Bergsbaken T, Rassoulian Barrett SL, Lara S, Cookson BT.** 2009. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* **72**:1395–407.
113. **Moon DC, Choi CH, Lee JH, Choi C-W, Kim H-Y, Park JS, Kim S II, Lee JC.** 2012. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol* **50**:155–60.
114. **Cascales E, Bernadac a., Gavioli M, Lazzaroni J-C, Lloubes R.** 2002. Pal lipoprotein of *Escherichia coli* plays a major role in outer membrane integrity. *J Bacteriol* **184**:754–759.
115. **Schwechheimer C, Rodriguez DL, Kuehn MJ.** 2015. NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen* **4**:375–389.
116. **Schwechheimer C, Kulp A, Kuehn MJ.** 2014. Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC Microbiol* **14**:324.
117. **Schwechheimer C, Kuehn MJ.** 2015. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* **13**:605–19.
118. **Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ.** 1995. Virulence Factors Are Released From *Pseudomonas-Aeruginosa* in Association With Membrane-Vesicles During Normal Growth and Exposure To Gentamicin - a Novel Mechanism of Enzyme-Secretion. *J Bacteriol* **177**:3998–4008.
119. **Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ.** 1996. Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* **178**:2767–74.
120. **Mashburn-Warren L, Howe J, Garidel P, Richter W, Steiniger F, Roessle M, Brandenburg K, Whiteley M.** 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* **69**:491–502.
121. **Elhenawy W, Bording-Jorgensen M, Valguarnera E, Haurat MF, Wine E, Feldman MF.** 2016. LPS remodeling triggers formation of outer membrane vesicles in salmonella. *MBio* **7**:1–12.
122. **Roier S, Zingl FG, Cakar F, Durakovic S, Kohl P, Eichmann TO, Klug L, Gadermaier B, Weinzerl K, Prassl R, Lass A, Daum G, Reidl J, Feldman MF, Schild S.** 2016. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun* **7**:10515.
123. **McMahon KJ, Castelli ME, García Vescovi E, Feldman MF.** 2012. Biogenesis of outer membrane vesicles in *Serratia marcescens* is thermoregulated and can be induced by activation of the Rcs phosphorelay system. *J Bacteriol* **194**:3241–9.
124. **Haurat MF, Aduse-Opoku J, Rangarajan M, Dorobantu L, Gray MR, Curtis M a, Feldman MF.** 2011. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J Biol Chem* **286**:1269–76.
125. **Elhenawy W, Debelyy MO, Feldman MF, Packing P, Glycosidases A, Outer B, Vesicles M, This S, Feeds RSS, Journal ASM.** 2014. Preferential Packing of Acidic

Glycosidases and Proteases into.

126. **McBroom AJ, Kuehn MJ.** 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* **63**:545–58.
127. **Lai CH, Listgarten MA, Hammond BF.** 1981. Comparative ultrastructure of leukotoxic and non-leukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontal Res* **16**:379–89.
128. **Wai SN, Takade A, Amako K.** 1995. The release of outer membrane vesicles from the strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **39**:451–6.
129. **Kato S, Kowashi Y, Demuth DR.** 2002. Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**:1–13.
130. **Rompikuntal PK, Thay B, Khan MK, Alanko J, Penttinen A-M, Asikainen S, Wai SN, Oscarsson J.** 2012. Perinuclear localization of internalized outer membrane vesicles carrying active cytolethal distending toxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **80**:31–42.
131. **Patrick S, McKenna JP, O'Hagan S, Dermott E.** 1996. A comparison of the haemagglutinating and enzymic activities of *Bacteroides fragilis* whole cells and outer membrane vesicles. *Microb Pathog* **20**:191–202.
132. **Hozbor D, Rodriguez ME, Fernández J, Lagares A, Guiso N, Yantorno O.** 1999. Release of outer membrane vesicles from *Bordetella pertussis*. *Curr Microbiol* **38**:273–278.
133. **Allan ND, Kooi C, Sokol P a, Beveridge TJ.** 2003. Putative virulence factors are released in association with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia*. *Can J Microbiol* **49**:613–624.
134. **Lindmark B, Rompikuntal PK, Vaitkevicius K, Song T, Mizunoe Y, Uhlin BE, Guerry P, Wai SN.** 2009. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol* **9**:220.
135. **Wai SN, Lindmark B, Söderblom T, Takade A, Westermarck M, Oscarsson J, Jass J, Richter-Dahlfors A, Mizunoe Y, Uhlin BE.** 2003. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**:25–35.
136. **Horstman AL, Kuehn MJ.** 2000. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane Vesicles * **275**:12489–12496.
137. **Balsalobre C, Silván JM, Berglund S, Mizunoe Y, Uhlin BE, Wai SN.** 2006. Release of the type I secreted alfa-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**:99–112.
138. **Kouokam JC, Wai SN, Fällman M, Hacker J, Uhlin BE, Fa M, Dobrindt U.** 2006. Active Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Associated with Outer Membrane Vesicles from Uropathogenic *Escherichia coli* Active Cytotoxic Necrotizing Factor 1 Associated with Outer Membrane Vesicles from Uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**:2022–2030.
139. **Yokoyama K, Horii T, Yamashino T, Hashikawa S, Barua S, Hasegawa T, Watanabe H, Ohta M.** 2000. Production of Shiga toxin by *Escherichia coli* measured with reference

- to the membrane vesicle-associated toxins. FEMS Microbiol Lett **192**:139–144.
140. **Keenan J, Day T, Neal S, Cook B, Perez-Perez G, Allardyce R, Bagshaw P.** 2000. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. FEMS Microbiol Lett **182**:259–264.
141. **Olofsson A, Vallström A, Petzold K, Tegtmeyer N, Schleucher J, Carlsson S, Haas R, Backert S, Wai SN, Gröbner G, Arnqvist A.** 2010. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. Mol Microbiol **77**:1539–1555.
142. **Fernandez-Moreira E, Helbig JH, Swanson MS.** 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. Infect Immun **74**:3285–3295.
143. **Galka F, Wai SN, Kusch H, Engelmann S, Hecker M, Schmeck B, Hippenstiel S, Uhlin BE, Steinert M.** 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. Infect Immun **76**:1825–1836.
144. **Kahnt JJ, Aguiluz K, Koch JJ, Treuner-Lange A, Konovalova A, Huntley S, Hoppert M, Søgaard-Andersen L, Hedderich R.** 2010. Profiling the outer membrane proteome during growth and development of the social bacterium *myxococcus xanthus* by selective biotinylation and analyses of outer membrane vesicles. J Proteome Res **9**:5197–5208.
145. **Vipond C, Suker J, Jones C, Tang C, Feavers IM, Wheeler JX.** 2006. Proteomic analysis of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from the group B strain NZ98/254. Proteomics **6**:3400–3413.
146. **Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D.** 2004. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. Microb Pathog **36**:319–25.
147. **Ciofu O, Beveridge TJ, Kadurugamuwa J, Walther-Rasmussen J, Høiby N.** 2000. Chromosomal beta-lactamase is packaged into membrane vesicles and secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother **45**:9–13.
148. **Montes LR, Ibarguren M, Goñi FM, Stonehouse M, Vasil ML, Alonso A.** 2007. Leakage-free membrane fusion induced by the hydrolytic activity of PlcHR2, a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta - Biomembr **1768**:2365–2372.
149. **Huang C, Xu KD, Mcfeters G a, Stewart S, Feters G a MC.** 1998. Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation **64**:1526–1531.
150. **Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh B a, Ye S, O'Toole G a, Stanton B a.** 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. PLoS Pathog **5**:e1000382.
151. **Kitagawa R, Takaya A, Ohya M, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida SI, Isogai E, Yamamoto T.** 2010. Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. J Bacteriol **192**:5645–5656.
152. **Kadurugamuwa JL, Beveridge TJ.** 1998. Delivery of the Non-Membrane-Permeative Antibiotic Gentamicin into Mammalian Cells by Using *Shigella flexneri* Membrane Vesicles Delivery of the Non-Membrane-Permeative Antibiotic Gentamicin into

- Mammalian Cells by Using *Shigella flexneri* Membrane Vesicles **42**:1476–1483.
153. **Dutta S, Iida K, Takade A, Meno Y, Nair GB, Yoshida S.** 2004. Release of Shiga toxin by membrane vesicles in *Shigella dysenteriae* serotype 1 strains and in vitro effects of antimicrobials on toxin production and release. *Microbiol Immunol* **48**:965–9.
 154. **Chi B, Qi M, Kuramitsu HK.** 2003. Role of dentilisin in *Treponema denticola* epithelial cell layer penetration. *Res Microbiol* **154**:637–643.
 155. **Boardman BK, Meehan BM, Satchell KJF.** 2007. Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export. *J Bacteriol* **189**:1827–1835.
 156. **Rompikuntal PK, Vdovikova S, Duperthuy M, Johnson TL, Åhlund M, Lundmark R, Oscarsson J, Sandkvist M, Uhlin BE, Wai SN.** 2015. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One* **10**:1–22.
 157. **Chatterjee D, Chaudhuri K.** 2011. Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* **585**:1357–1362.
 158. **Khandelwal P, Banerjee-Bhatnagar N.** 2003. Insecticidal activity associated with the outer membrane vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl Env Microbiol* **69**:2032–2037.
 159. **Kesty NC, Mason KM, Reedy M, Miller SE, Kuehn MJ.** 2004. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* **23**:4538–49.
 160. **Horstman AL, Kuehn MJ.** 2002. Bacterial Surface Association of Heat-labile Enterotoxin through Lipopolysaccharide after Secretion via the General Secretory Pathway. *J Biol Chem* **277**:32538–32545.
 161. **Hatakeyama M.** 2008. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **11**:30–37.
 162. **Manning AJ, Kuehn MJ.** 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**:258.
 163. **Li Z, Clarke AJ, Beveridge TJ, Acteriol JB.** 1996. A Major Autolysin of *Pseudomonas aeruginosa* : Subcellular Distribution , Potential Role in Cell Growth and Division , and Secretion in Surface Membrane Vesicles Downloaded from <http://jb.asm.org/> on December 5 , 2014 by The University of British Columbia **178**:2479–2488.
 164. **Fulsundar S, Harms K, Flaten GE, Johnsen PJ, Chopade BA, Nielsen KM.** 2014. Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Appl Environ Microbiol* **80**:3469–3483.
 165. **González LJ, Bahr G, Nakashige TG, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ.** 2016. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nat Chem Biol* **12**:516–22.
 166. **Gankema H, Wensink J, Guinée PA, Jansen WH, Witholt B.** 1980. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **29**:704–13.
 167. **Shoberg RJ, Thomas DD.** 1993. Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. *Infect Immun* **61**:3892–3900.

168. **Bauman SJ, Kuehn MJ.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. *BMC Microbiol* **9**:26.
169. **O'Donoghue EJ, Krachler AM.** 2016. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol* 1508–1517.
170. **Vanaja SK, Russo AJ, Behl B, Banerjee I, Yankova M, Deshmukh SD, Rathinam VAK.** 2016. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. *Cell* **165**:1106–1119.
171. **Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, Amano A.** 2009. *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun* **77**:4187–96.
172. **Kaparakis M, Turnbull L, Carneiro L, Firth S, Coleman HA, Parkington HC, Le Bourhis L, Karrar A, Viala JJ, Mak J, Hutton ML, Davies JK, Crack PJ, Hertzog PJ, Philpott DJ, Girardin SE, Whitchurch CB, Ferrero RL.** 2010. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. *Cell Microbiol* **12**:372–85.
173. **Schaar V, De Vries SPW, Perez Vidakovics MLA, Bootsma HJ, Larsson L, Hermans PWM, Bjartell A, Mörgelin M, Riesbeck K.** 2011. Multicomponent *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles induce an inflammatory response and are internalized by human epithelial cells. *Cell Microbiol* **13**:432–449.
174. **Sharpe SW, Kuehn MJ, Mason KM.** 2011. Elicitation of epithelial cell-derived immune effectors by outer membrane vesicles of nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **79**:4361–4369.
175. **Thay B, Damm A, Kufer TA, Wai SN, Oscarsson J.** 2014. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane vesicles are internalized in human host cells and trigger NOD1- and NOD2-dependent NF- κ B activation. *Infect Immun* **82**:4034–4046.
176. **Mondal A, Tapader R, Chatterjee NS, Ghosh A, Sinha R, Koley H, Saha DR, Chakrabarti MK, Wai SN, Pal A.** 2016. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **84**:1478–1490.
177. **Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF.** 2014. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell vesicles* **3**:1–14.
178. **Jäger J, Keese S, Roessle M, Steinert M, Schromm AB.** 2014. Fusion of *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles with eukaryotic membrane systems is a mechanism to deliver pathogen factors to host cell membranes. *Cell Microbiol* 1–29.
179. **Aung KM, Sjöström AE, von Pawel-Rammingen U, Riesbeck K, Uhlin BE, Wai SN.** 2016. Naturally Occurring IgG Antibodies Provide Innate Protection against *Vibrio cholerae* Bacteremia by Recognition of the Outer Membrane Protein U. *J Innate Immun* 269–283.
180. **Winter J, Letley D, Rhead J, Atherton J, Robinson K.** 2014. *Helicobacter pylori* membrane vesicles stimulate innate pro- and anti-inflammatory responses and induce apoptosis in Jurkat T Cells. *Infect Immun* **82**:1372–1381.
181. **Vidakovics MLAP, Jendholm J, Mörgelin M, Månsson A, Larsson C, Cardell L-O, Riesbeck K.** 2010. B cell activation by outer membrane vesicles--a novel virulence mechanism. *PLoS Pathog* **6**:e1000724.

182. **Orench-Rivera N, Kuehn M.** 2016. Environmentally-Controlled Bacterial Vesicle-Mediated Export. *Cell Microbiol* 1525–1536.
183. **Schwechheimer C, Kuehn MJ.** 2013. Synthetic Effect Between Envelope Stress and the Lack of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*.
184. **Macdonald I a, Kuehn MJ.** 2013. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **195**:2971–81.
185. **Rakoff-Nahoum S, Coyne MJ, Comstock LE.** 2014. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Curr Biol* **24**:40–49.
186. **Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW.** 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* **343**:183–6.
187. **Schooling SR, Beveridge TJ.** 2006. Membrane vesicles: An overlooked component of the matrices of biofilms. *J Bacteriol* **188**:5945–5957.
188. **Remis JP, Wei D, Gorur A, Zemla M, Haraga J, Allen S, Witkowska HE, Costerton JW, Berleman JE, Auer M.** 2014. Bacterial social networks: Structure and composition of *Myxococcus xanthus* outer membrane vesicle chains. *Environ Microbiol* **16**:598–610.
189. **Schooling SR, Hubley A, Beveridge TJ.** 2009. Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **191**:4097–4102.
190. **Li Z, Clarke a J, Beveridge TJ.** 1998. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol* **180**:5478–5483.
191. **Mashburn LM, Whiteley M.** 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**:422–5.
192. **Robbins PD, Morelli AE.** 2014. Regulation of Immune Responses by Extracellular Vesicles. *Nat Rev Immunol* **14**:195–208.
193. **Collins B.** 2011. Gram-negative Outer Membrane Vesicles in Vaccine Development. *Discov Med* **12**:7–15.
194. **Gujrati V, Kim S, Kim S-H, Min JJ, Choy HE, Kim SC, Jon S.** 2014. Bioengineered Bacterial Outer Membrane Vesicles as Cell-Specific Drug-Delivery Vehicles for Cancer Therapy. *ACS Nano*.
195. **Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A.** 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*.
196. **Gurung M, Moon DC, Choi CW, Lee JH, Bae YC, Kim J, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim S II, Lee JC.** 2011. *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One* **6**.
197. **Prados-Rosales R, Baena A, Martinez LR, Luque-Garcia J, Kalscheuer R, Veeraraghavan U, Camara C, Nosanchuk JD, Besra GS, Chen B, Jimenez J, Glatman-Freedman A, Jacobs WR, Porcelli SA, Casadevall A.** 2011. Mycobacteria release active membrane vesicles that modulate immune responses in a TLR2-dependent manner in mice. *J Clin Invest* **121**:1471–1483.
198. **Grimm R, Singh H, Rachel R, Typke D, Zillig W, Baumeister W.** 1998. Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophys J* **74**:1031–42.

199. **Näther DJ, Rachel R.** 2004. The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem Soc Trans* **32**:199–203.
200. **Prangishvili D, Holz I, Stieger E, Nickell S, Kristjansson JK, Zillig W.** 2000. Sulfolobocins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* **182**:2985–2988.
201. **Beier D, Gross R.** 2006. Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Curr Opin Microbiol* **9**:143–152.
202. **Stock AM, Robinson VL, Goudreau PN.** 2000. Two-Component Signal Transduction. *Reactions* **69**:183–215.
203. **Kiba T, Taniguchi M, Imamura A, Ueguchi C, Mizuno T, Sugiyama T.** 1999. Differential expression of genes for response regulators in response to cytokinins and nitrate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **40**:767–771.
204. **Hoch JA.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**:165–170.
205. **Bourret RB, Silversmith RE.** 2011. Two-component signal transduction. *Natl Institute Heal* **13**:113–115.
206. **Goulian M.** 2011. Two-Component Signaling Circuit Structure and Properties. *Curr Opin Microbiol* **13**:184–189.
207. **Pogliano J, Lynch a S, Belin D, Lin EC, Beckwith J.** 1997. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev* **11**:1169–1182.
208. **Vogt SL, Raivio TL.** 2011. Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* **326**:2–11.
209. **Yamamoto K, Ishihama A.** 2006. Characterization of copper-inducible promoters regulated by CpxA/CpxR in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**:1688–95.
210. **Raivio TL.** 2014. Everything old is new again: An update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**:1529–1541.
211. **Danese PN, Silhavy TJ.** 1997. The sE and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding systems in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **11**:1183–1193.
212. **Snyder WB, Davis LJB, Danese PN, Cosma CL, Silhavy TJ.** 1995. Overproduction of nlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic lacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J Bacteriol* **177**:4216–4223.
213. **Otto K, Silhavy TJ.** 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2287–2292.
214. **DiGiuseppe P a, Silhavy TJ.** 2003. Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System Signal Detection and Target Gene Induction by the CpxRA Two-Component System. *J Bacteriol* **185**:2432–2440.
215. **Danese PN, Silhavy TJ.** 1998. CpxP, a stress-combative member of the Cpx regulon. *J Bacteriol* **180**:831–839.

216. **Isaac DD, Pinkner JS, Hultgren SJ, Silhavy TJ.** 2005. The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:17775–17779.
217. **Raivio TL, Popkin DL, Silhavy TJ.** 1999. The Cpx Envelope Stress Response Is Controlled by Amplification and Feedback Inhibition The Cpx Envelope Stress Response Is Controlled by Amplification and Feedback Inhibition **181**:5263–5272.
218. **Raivio TL, Silhavy TJ.** 1997. Transduction of envelope stress in Escherichia coli by the Cpx two-component system . Transduction of Envelope Stress in Escherichia coli by the Cpx Two-Component System. *Am Soc Microbiol* **179**:7724–7733.
219. **Fleischer R, Heermann R, Jung K, Hunke S.** 2007. Purification, reconstitution, and characterization of the CpxRAP envelope stress system of Escherichia coli. *J Biol Chem* **282**:8583–8593.
220. **De Wulf P, Kwon O, Lin ECC.** 1999. The CpxRA signal transduction system of Escherichia coli: Growth-related autoactivation and control of unanticipated target operons. *J Bacteriol* **181**:6772–6778.
221. **Wolfe AJ, Parikh N, Lima BP, Zemaitaitis B.** 2008. Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR. *J Bacteriol* **190**:2314–2322.
222. **Lima BP, Antelmann H, Gronau K, Chi BK, Becher D, Brinsmade SR, Wolfe AJ.** 2011. Involvement of protein acetylation in glucose-induced transcription of a stress-responsive promoter. *Mol Microbiol* **81**:1190–1204.
223. **Price NL, Raivio TL.** 2009. Characterization of the Cpx Regulon in Escherichia coli Strain MC4100. *J Bacteriol* **191**:1798–1815.
224. **De Wulf P, McGuire AM, Liu X, Lin ECC.** 2002. Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in Escherichia coli. *J Biol Chem* **277**:26652–26661.
225. **Gerken H, Charlson ES, Cicirelli EM, Kenney LJ, Misra R.** 2009. MzrA: a novel modulator of the EnvZ/OmpR two-component regulon. *Mol Microbiol* **72**:1408–22.
226. **Batchelor E, Walthers D, Kenney LJ, Goulian M.** 2005. The Escherichia coli CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC The Escherichia coli CpxA-CpxR Envelope Stress Response System Regulates Expression of the Porins OmpF and OmpC. *J Bacteriol* **187**:5723–5731.
227. **Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, Hirata T, Yamaguchi A.** 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **55**:1113–1126.
228. **Dorel C, Lejeune P, Rodrigue A.** 2006. The Cpx system of Escherichia coli, a strategic signaling pathway for confronting adverse conditions and for settling biofilm communities? *Res Microbiol* **157**:306–314.
229. **Ogasawara H, Yamada K, Kori A, Yamamoto K, Ishihama A.** 2010. Regulation of the Escherichia coli csgD promoter: Interplay between five transcription factors. *Microbiology* **156**:2470–2483.
230. **Vogt SL, Nevesinjac AZ, Humphries RM, Donnenberg MS, Armstrong GD, Raivio TL.** 2010. The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic Escherichia coli bundle-forming pilus. *Mol Microbiol* **76**:1095–1110.

231. **Hung DL, Raivio TL, Jones CH, Silhavy TJ, Hultgren SJ.** 2001. Cpx signaling pathway monitors biogenesis and affects assembly and expression of P pili. *EMBO J* **20**:1508–1518.
232. **Nakayama SI, Watanabe H.** 1998. Identification of cpxR as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei* virF gene. *J Bacteriol* **180**:3522–3528.
233. **Humphreys S, Rowley G, Stevenson A, Muna F, Woodward MJ, Gilbert S, Roberts M, Anjum MF, Kormanec J.** 2004. Role of the Two-Component Regulator CpxAR in the Virulence of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Infect Immun* **72**:4654–4661.
234. **Altman E, Segal G.** 2008. The response regulator CpxR directly regulates expression of several *Legionella pneumophila* icm/dot components as well as new translocated substrates. *J Bacteriol* **190**:1985–96.
235. **Adams MD, Venter JC.** 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**:2185–95.
236. **Brand AH, Perrimon N.** 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**:401–15.
237. **Zhong J, Yedvobnick B.** 2009. Targeted gain-of-function screening in *Drosophila* using GAL4-UAS and random transposon insertions. *Genet Res (Camb)* **91**:243–58.
238. **Kennerdell JR, Carthew RW.** 2000. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* **18**:896–8.
239. **Rubin GM, Spradling AC.** 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**:348–53.
240. **Jenkins JB.** 1967. Mutagenesis at a complex locus in *Drosophila* with the monofunctional alkylating agent, ethyl methanesulfonate. *Genetics* **57**:783–93.
241. **Jenkins JB.** 1967. The induction of mosaic and complete dumpy mutants in *Drosophila melanogaster* with ethyl methanesulfonate. *Mutat Res* **4**:90–2.
242. **Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E.** 2001. A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In. *Genome Res* **11**:114–125.
243. **Panayidou S, Ioannidou E, Apidianakis Y.** 2014. Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*: disease modeling, lessons, and shortcomings. *Virulence* **5**:253–69.
244. **Tukhvatulin AI, Logunov DY, Shcherbinin DN, Shmarov MM, Naroditsky BS, Gudkov A V, Gintsburg AL.** 2010. Toll-like receptors and their adapter molecules. *Biochemistry (Mosc)* **75**:1098–114.
245. **Nappi AJ, Vass E, Frey F, Carton Y.** 1995. Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *Eur J Cell Biol* **68**:450–6.
246. **Nam H-J, Jang I-H, You H, Lee K-A, Lee W-J.** 2012. Genetic evidence of a redox-dependent systemic wound response via Hayan Protease-Phenoloxidase system in *Drosophila*. *EMBO J* **31**:1253–1265.
247. **Braun A, Hoffmann JA, Meister M.** 1998. Analysis of the *Drosophila* host defense in

- domino mutant larvae, which are devoid of hemocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:14337–42.
248. **Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C, Hoffmann JA.** 2007. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* **7**:862–74.
249. **Lemaitre B, Hoffmann J.** 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**:697–743.
250. **Vallet-Gely I, Lemaitre B, Boccard F.** 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nat Rev Microbiol* **6**:302–13.
251. **Kounatidis I, Ligoxygakis P.** 2012. *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol* **2**:120075–120075.
252. **Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D.** 2003. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* **302**:2126–30.
253. **Bischoff V, Vignal C, Boneca IG, Michel T, Hoffmann JA, Royet J.** 2004. Function of the *drosophila* pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **5**:1175–80.
254. **Chamy L El, Leclerc V, Caldelari I, Reichhart J-M.** 2008. Danger signal and PAMP sensing define binary signaling pathways upstream of Toll. *Nat Immunol* **9**:1165–1170.
255. **Gottar M, Gobert V, Matskevich AA, Reichhart J-M, Wang C, Butt TM, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D.** 2006. Dual detection of fungal infections in *Drosophila* via recognition of glucans and sensing of virulence factors. *Cell* **127**:1425–37.
256. **Ligoxygakis P, Hoffmann JA, Reichhart J.** 2002. Activation of *Drosophila* Toll During Fungal Infections by a Blood Serine Protease. *Science* (80-) **297**:114–116.
257. **Sun H, Towb P, Chiem DN, Foster BA, Wasserman SA.** 2004. Regulated assembly of the Toll signaling complex drives *Drosophila* dorsoventral patterning. *EMBO J* **23**:100–10.
258. **Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N.** 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* **20**:637–49.
259. **Biteau B, Jasper H.** 2011. EGF signaling regulates the proliferation of intestinal stem cells in *Drosophila*. *Development* **138**:1045–1055.
260. **Boutros M, Agaisse H, Perrimon N.** 2002. Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**:711–22.
261. **Silverman N, Zhou R, Erlich RL, Hunter M, Bernstein E, Schneider D, Maniatis T.** 2003. Immune activation of NF-kappaB and JNK requires *Drosophila* TAK1. *J Biol Chem* **278**:48928–34.
262. **Park JM, Brady H, Ruocco MG, Sun H, Williams D, Lee SJ, Kato T, Richards N, Chan K, Mercurio F, Karin M, Wasserman SA.** 2004. Targeting of TAK1 by the NF-kappa B protein Relish regulates the JNK-mediated immune response in *Drosophila*. *Genes Dev* **18**:584–94.

263. **Delaney JR, Mlodzik M.** 2006. TGF-beta activated kinase-1: new insights into the diverse roles of TAK1 in development and immunity. *Cell Cycle* **5**:2852–5.
264. **Charroux B, Royet J.** 2009. Elimination of plasmatocytes by targeted apoptosis reveals their role in multiple aspects of the *Drosophila* immune response. *Proc Natl Acad Sci* **106**:9797–9802.
265. **Nehme NT, Quintin J, Cho JH, Lee J, Lafarge MC, Kocks C, Ferrandon D.** 2011. Relative roles of the cellular and humoral responses in the *Drosophila* host defense against three gram-positive bacterial infections. *PLoS One* **6**.
266. **Defaye A, Evans I, Crozatier M, Wood W, Lemaitre B, Leulier F.** 2009. Genetic Ablation of *Drosophila* Phagocytes Reveals Their Contribution to Both Development and Resistance to Bacterial Infection. *J Innate Immun* **1**:322–334.
267. **Ashida M.** The prophenoloxidase cascade in insect immunity. *Res Immunol* **141**:908–10.
268. **Kanost MR.** Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Dev Comp Immunol* **23**:291–301.
269. **Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K.** 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends Immunol* **29**:263–71.
270. **Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U.** 2009. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. *J Innate Immun* **1**:301–8.
271. **Kuraishi T, Hori A, Kurata S.** 2013. Host-microbe interactions in the gut of *Drosophila melanogaster*. *Front Physiol* **4 DEC**:1–8.
272. **Bier E, Guichard a.** 2012. Deconstructing host-pathogen interactions in *Drosophila*. *Dis Model Mech* **5**:48–61.
273. **Castelli E, Fedrigo G V, Clementi AL, Vero M, Feldman MF, Garci E.** 2008. Enterobacterial Common Antigen Integrity Is a Checkpoint for Flagellar Biogenesis in *Serratia marcescens* □ **190**:213–220.
274. **Bruna RE, Revale S, García Vescovi E, Mariscotti JF.** 2015. Draft Whole-Genome Sequence of *Serratia marcescens* Strain RM66262, Isolated from a Patient with a Urinary Tract Infection. *Genome Announc* **3**:e01423–15.
275. **Flyg C, Kenne K, Boman HG.** 1980. Insect pathogenic properties of *Serratia marcescens*: phage-resistant mutants with a decreased resistance to *Cecropia* immunity and a decreased virulence to *Drosophila*. *J Gen Microbiol* **120**:173–81.
276. **Sambrook J, Fritdch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
277. **Simon R, Priefer U, Pühler a.** 1983. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology* **1**:784–791.
278. **Figurski DH, Helinski DR.** 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:1648–52.
279. **Romano PS, Gutierrez MG, Berón W, Rabinovitch M, Colombo MI.** 2007. The

- autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cell Microbiol* **9**:891–909.
280. **Rutschmann S, Jung AC, Hetru C, Reichhart JM, Hoffmann JA, Ferrandon D.** 2000. The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity* **12**:569–580.
 281. **Ayyaz A, Giammarinaro P, Liégeois S, Lestrade M, Ferrandon D.** 2013. A negative role for MyD88 in the resistance to starvation as revealed in an intestinal infection of *Drosophila melanogaster* with the Gram-positive bacterium *Staphylococcus xylosus*. *Immunobiology* **218**:635–644.
 282. **Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D.** 2002. Cutting edge: the toll pathway is required for resistance to gram-positive bacterial infections in *Drosophila*. *J Immunol* **168**:1542–1546.
 283. **Kovach ME, Elzer PH, Steven Hill D, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175–176.
 284. **Miller WG, Leveau JHJ, Lindow SE, Biology M, Hall K.** 2000. Improved gfp and inaZ Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors **13**:1243–1250.
 285. **Alexeyev MF.** 1999. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of Gram-negative bacteria. *Biotechniques* **26**:824–828.
 286. **Kaniga K, Delor I, Cornelis GR.** 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137–141.
 287. **Niehus S, Giammarinaro P, Liégeois S, Quintin J, Ferrandon D.** 2012. Fly culture collapse disorder: detection, prophylaxis and eradication of the microsporidian parasite *Tubulinosema ratisbonensis* infecting *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin)* **6**:193–204.
 288. **Chevallet M, Luche S, Rabilloud T.** 2006. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc* **1**:1852–1858.
 289. **Lane D, Prentki P, Chandler M.** 1992. Use of gel retardation to analyze protein-nucleic acid interactions. *Microbiol Rev* **56**:509–528.
 290. **Galas DJ, Schmitz a.** 1978. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res* **5**:3157–3170.
 291. **Sanger F, Nicklen S, Coulson a R.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463–7.
 292. **Bauman SJ, Kuehn MJ.** 2006. Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect* **8**:2400–8.
 293. **Bailey TL, Gribskov M.** 1998. Methods and statistics for combining motif match scores. *J Comput Biol* **5**:211–21.
 294. **Grant CE, Bailey TL, Noble WS.** 2011. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* **27**:1017–1018.

295. **Soult MC, Lonergan NE, Shah B, Kim W-K, Britt LD, Sullivan CJ.** 2013. Outer membrane vesicles from pathogenic bacteria initiate an inflammatory response in human endothelial cells. *J Surg Res* 1–9.
296. **Yoon H, Ansong C, Adkins JN, Heffron F.** 2011. Discovery of Salmonella virulence factors translocated via outer membrane vesicles to murine macrophages. *Infect Immun* **79**:2182–92.
297. **Pollak CN, Delpino MV, Fossati C a, Baldi PC.** 2012. Outer membrane vesicles from Brucella abortus promote bacterial internalization by human monocytes and modulate their innate immune response. *PLoS One* **7**:e50214.
298. **López-Yglesias AH, Zhao X, Quarles EK, Lai M a, VandenBos T, Strong RK, Smith KD.** 2014. Flagellin induces antibody responses through a TLR5- and inflammasome-independent pathway. *J Immunol* **192**:1587–96.
299. **Olsen JE, Hoegh-Andersen KH, Casadesús J, Rosenkranzt J, Chadfield MS, Thomsen LE.** 2013. The role of flagella and chemotaxis genes in host pathogen interaction of the host adapted Salmonella enterica serovar Dublin compared to the broad host range serovar S. Typhimurium. *BMC Microbiol* **13**:67.
300. **Scavone P, Villar S, Umpierrez A, Zunino P.** 2015. Role of Proteus mirabilis MR/P fimbriae and flagella in adhesion, cytotoxicity and genotoxicity induction in T24 and Vero cells. *Pathog Dis* **73**:ftv017–ftv017.
301. **Oliveros J.** VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn diagrams. BioinfoGP, CNB-CSIC.
302. **Lee E-Y, Bang JY, Park GW, Choi D-S, Kang JS, Kim H-J, Park K-S, Lee J-O, Kim Y-K, Kwon K-H, Kim K-P, Gho YS.** 2007. Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli. *Proteomics* **7**:3143–53.
303. **Altindis E, Fu Y, Mekalanos JJ.** 2014. Proteomic analysis of Vibrio cholerae outer membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci* **2014**.
304. **Jang K-S, Sweredoski MJ, Graham RLJ, Hess S, Clemons WM.** 2014. Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from Campylobacter jejuni. *J Proteomics* **98**:90–8.
305. **Puorger C, Vetsch M, Wider G, Glockshuber R.** 2011. Structure, folding and stability of FimA, the main structural subunit of type 1 Pili from uropathogenic escherichia coli strains. *J Mol Biol* **412**:520–535.
306. **Akatsuka H, Binet R, Kawai E, Wandersman C, Omori A.** 1997. Lipase secretion by bacterial hybrid ATP-binding cassette exporters: Molecular recognition of the LipBCD, PrtDEF, and HasDEF exporters. *J Bacteriol* **179**:4754–4760.
307. **Bonnington KE, Kuehn MJ.** 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1843**:1612–1619.
308. **Takii R, Kadowaki T, Baba A, Tsukuba T, Yamamoto K.** 2005. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems. *Infect Immun* **73**:883–893.
309. **Czuprynski CJ, Welch RA.** 1995. Biological effects of RTX toxins: the possible role of lipopolysaccharide. *Trends Microbiol* **3**:480–483.

310. **Beddoe T, Paton AW, Le Nours J, Rossjohn J, Paton JC.** 2010. Structure, biological functions and applications of the AB5 toxins. *Trends Biochem Sci* **35**:411–418.
311. **Corbin RW, Paliy O, Yang F, Shabanowitz J, Platt M, Lyons CE, Root K, McAuliffe J, Jordan MI, Kustu S, Soupene E, Hunt DF.** 2003. Toward a protein profile of *Escherichia coli*: comparison to its transcription profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9232–7.
312. **Wei C, Yang J, Zhu J, Zhang X, Leng W, Wang J, Xue Y, Sun L, Li W, Wang J, Jin Q.** 2006. Comprehensive Proteomic Analysis of *Shigella flexneri* 2a Membrane Proteins. *J Proteome Res* **5**:1860–1865.
313. **Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, Brunelli B, Giuliani MM, Pizza M, Norais N, Grandi G.** 2006. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* gna33 mutant: Proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* **6**:1856–1866.
314. **Pérez-Cruz C, Delgado L, López-Iglesias C, Mercade E.** 2015. Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS One* **10**:1–18.
315. **Henderson B, Martin A.** 2011. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* **79**:3476–91.
316. **Pancholi V, Fischetti VA.** 1992. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J Exp Med* **176**:415–26.
317. **Blau K, Portnoi M, Shagan M, Kaganovich A, Rom S, Kafka D, Chalifa Caspi V, Porgador A, Givon-Lavi N, Gershoni JM, Dagan R, Mizrahi Nebenzahl Y.** 2007. Flamingo cadherin: a putative host receptor for *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **195**:1828–37.
318. **Tunio SA, Oldfield NJ, Berry A, Ala'Aldeen DAA, Wooldridge KG, Turner DPJ.** 2010. The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion. *Mol Microbiol* **76**:605–15.
319. **Katakura Y, Sano R, Hashimoto T, Ninomiya K, Shioya S.** 2010. Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**:319–26.
320. **Gobert AP, Bambou J-C, Werts C, Balloy V, Chignard M, Moran AP, Ferrero RL.** 2004. *Helicobacter pylori* heat shock protein 60 mediates interleukin-6 production by macrophages via a toll-like receptor (TLR)-2-, TLR-4-, and myeloid differentiation factor 88-independent mechanism. *J Biol Chem* **279**:245–50.
321. **Kamiya S, Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H.** 1998. A virulence factor of *Helicobacter pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* **27 Suppl 1**:S35–9.
322. **Kulp A, Kuehn MJ.** 2010. Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**:163–184.
323. **Galdiero M, Folgore A, Moliterno M, Greco R.** 1999. Porins and lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella typhimurium* induce leucocyte transmigration through human endothelial cells in vitro. *Clin Exp Immunol* **116**:453–461.

324. **Korn A, Rajabi Z, Wassum B, Ruiner W, Nixdorff K.** 1995. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by the major outer membrane protein OmpA of gram-negative bacteria. *Infect Immun* **63**:2697–2705.
325. **Prasadarao N V, Wass CA, Weiser JN, Stins MF, Huang SH, Kim KS.** 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **64**:146–153.
326. **Maldonado R, Wei R, Kachlany SC, Kazi M, Balashova N V.** Cytotoxic effects of *Kingella kingae* outer membrane vesicles on human cells. *Microb Pathog* **51**:22–30.
327. **Schwechheimer C, Sullivan CJ, Kuehn MJ.** 2013. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry* **52**:3031–40.
328. **Mosmann T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55–63.
329. **Walker G, Hertle R, Braun V.** 2004. Activation of *Serratia marcescens* Hemolysin through a Conformational Change **72**:611–614.
330. **Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T.** 2003. Erratum: LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing (*EMBO Journal* (2000) 19 (5720-5728)). *EMBO J* **22**:4577.
331. **Kuehn MJ, Kesty NC.** 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* **19**:2645–55.
332. **Bielaszewska M, Rüter C, Kunsmann L, Greune L, Bauwens A, Zhang W, Kuczius T, Kim KS, Mellmann A, Schmidt MA, Karch H.** 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin Employs Outer Membrane Vesicles to Target Mitochondria and Cause Endothelial and Epithelial Apoptosis. *PLoS Pathog* **9**:e1003797.
333. **Cronin SJF, Nehme NT, Limmer S, Liegeois S, Pospisilik JA, Schramek D, Leibbrandt A, Simoes RDM, Gruber S, Puc U, Ebersberger I, Zoranovic T, Neely GG, von Haeseler A, Ferrandon D, Penninger JM, Pospisilik AJ.** 2010. In vivo genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection. *Science* (80-) **325**:340–343.
334. **Lee K-Z, Lestradet M, Socha C, Schirmeier S, Schmitz A, Spenlé C, Lefebvre O, Keime C, Yamba WM, Aoun RB, Liegeois S, Schwab Y, Simon-, Simon-Assmann P, Dalle F, Ferrandon D.** 2016. Enterocyte purge and rapid recovery is a resilience reaction of the gut epithelium to pore-forming toxin attack. *Cell Host Microbe* **?**:?
335. **Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU.** 2012. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* **03**:997–1019.
336. **Ha E, Lee W-J.** 2013. A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. *Science* (80-) **847**.
337. **Chitcholtan K, Hampton MB, Keenan JI.** 2008. Outer membrane vesicles enhance the carcinogenic potential of *Helicobacter pylori*. *Carcinogenesis* **29**:2400–5.
338. **Tyrer P, Frizelle F, Keenan J.** 2014. *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles are genotoxic to human enterocyte-like cells. *Infect Agent Cancer* **9**:2.
339. **Ciapponi L, Jackson DB, Mlodzik M, Bohmann D.** 2001. *Drosophila* Fos mediates

- ERK and JNK signals via distinct phosphorylation sites. *Genes Dev* **15**:1540–1553.
340. **Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P.** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**:239–253.
 341. **Smith SGJ, Mahon V, Lambert MA, Fagan RP.** 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**:1–11.
 342. **Freudl R.** 1989. Insertion of peptides into cell-surface-exposed areas of the *Escherichia coli* OmpA protein does not interfere with export and membrane assembly. *Gene* **82**:229–236.
 343. **Verhoeven GS, Alexeeva S, Dogterom M, den Blaauwen T.** 2009. Differential bacterial surface display of peptides by the transmembrane domain of OmpA. *PLoS One* **4**:e6739.
 344. **Rao Movva N, Nakamura K, Inouye M.** 1980. Amino Acid Sequence of the Signal Peptide of OmpA Protein, a Major Outer Membrane Protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **255**:27–29.
 345. **Griffin BA, Adams SR, Tsien RY.** 1998. Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science* (80-) **281**:269.
 346. **Hoffmann C, Gaietta G, Zürn A, Adams SR, Terrillon S, Ellisman MH, Tsien RY, Lohse MJ.** 2010. Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells. *Nat Protoc* **5**:1666–77.
 347. **Sciara MI, Spagnuolo C, Jares-Erijman E, García Véscovi E.** 2008. Cyto-localization of the PhoP response regulator in *Salmonella enterica*: Modulation by extracellular Mg²⁺ and by the SCV environment. *Mol Microbiol* **70**:479–493.
 348. **Lee DJ, Lee JB, Jang HA, Ferrandon D, Lee BL.** 2016. An antimicrobial protein of the *Riptortus pedestris* salivary gland was cleaved by a virulence factor of *Serratia marcescens*. *Dev Comp Immunol*.
 349. **Akaike T, Molla A, Ando M, Araki S, Maeda H.** 1989. Molecular mechanism of complex infection by bacteria and virus analyzed by a model using serratal protease and influenza virus in mice. *J Virol* **63**:2252–9.
 350. **Shanks RMQ, Stella N a, Arena KE, Fender JE.** 2013. Mutation of *crp* mediates *Serratia marcescens* serralysin and global secreted protein production. *Res Microbiol* **164**:38–45.
 351. **Tanikawa T, Nakagawa Y, Matsuyama T.** 2006. Prodigiosin and Serrawettin W1 Biosynthesis in *Serratia marcescens* **50**:587–596.
 352. **Brothers KM, Stella NA, Romanowski EG, Kowalski RP, Shanks RMQ.** 2015. EepR Mediates Secreted-Protein Production, Desiccation Survival, and Proliferation in a Corneal Infection Model **83**:4373–4382.
 353. **Stella NA, Lahr RM, Brothers KM, Kalivoda EJ, Hunt KM, Kwak DH, Liu X, Shanks RMQ.** 2015. *Serratia marcescens* CRP controls transcription of *eepR*, a novel regulator of antimicrobial secondary metabolites. *J Bacteriol* **197**:2468–2478.
 354. **Shanks RMQ, Shanks RMQ, Callaghan J.** 2016. Microbiology Suppressor analysis of *eepR* mutant defects reveals coordinate regulation of secondary metabolites and serralysin biosynthesis by EepR and HexS Current address : Department of Biological

- Sciences , University of Pittsburgh ,. Microbiology **Epub ahead.**
355. **Matsumoto K, Maeda H, Takata K, Kamata R, Okamura R.** 1984. Purification and characterization of four proteases from a clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. *J Bacteriol* **157**:225–32.
 356. **Park Y, Moon Y, Ryoo J, Kim N, Cho H, Ahn J.** 2012. Identification of the minimal region in lipase ABC transporter recognition domain of *Pseudomonas fluorescens* for secretion and fluorescence of green fluorescent protein. *Microb Cell Fact* **11**:60.
 357. **Petersen LM, Tisa LS.** 2012. Influence of temperature on the physiology and virulence of the insect pathogen *serratia* sp. Strain SCBI. *Appl Environ Microbiol* **78**:8840–8844.
 358. **Poole K, Braun V.** 1988. Influence of growth temperature and lipopolysaccharide on hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol* **170**:5146–5152.
 359. **Park D, Forst S.** 2006. Co-regulation of motility, exoenzyme and antibiotic production by the EnvZ-OmpR-FlhDC-FlhA pathway in *Xenorhabdus nematophila*. *Mol Microbiol* **61**:1397–412.
 360. **Lin C-S, Horng J-T, Yang C-H, Tsai Y-H, Su L-H, Wei C-F, Chen C-C, Hsieh S-C, Lu C-C, Lai H-C.** 2010. RssAB-FlhDC-ShlBA as a major pathogenesis pathway in *Serratia marcescens*. *Infect Immun* **78**:4870–81.
 361. **Majdalani N, Gottesman S.** 2005. The Rcs phosphorelay: a complex signal transduction system. *Annu Rev Microbiol* **59**:379–405.
 362. **De Wulf P, Akerley BJ, Lin ECC.** 2000. Presence of the Cpx system in bacteria. *Microbiology* **146**:247–248.
 363. **Nakayama S, Watanabe H.** 1995. Involvement of *cpxA*, a Sensor of a Two-Component Regulatory System , in the pH-Dependent Regulation of Expression of *Shigella sonnei* *virF* gene. *J Bacteriol* **177**:5062 – 5069.
 364. **Bearson S, Bearson B, Foster JW.** 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* **147**:173–180.
 365. **Peterson KM.** 2002. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. *CurrIssues Intest* **3**:29–38.
 366. **Tokishita S-I, Yamada H, Aiba H, Mizuno T.** 1990. Transmembrane Signal Transduction and Osmoregulation in *Escherichia coli*: II. The Osmotic Sensor, EnvZ, Located in the Isolated Cytoplasmic Membrane Displays Its Phosphorylation and Dephosphorylation Abilities as to the Activator Protein, OmpR. *J Biochem* **108**:488–493.
 367. **Skaar EP.** 2010. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* **6**:1–2.
 368. **Poole K, Braun V.** 1988. Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect Immun* **56**:2967–2971.
 369. **Tsaplina O, Bozhokina E, Mardanova A, Khaitlina S.** 2015. Virulence factors contributing to invasive activities of *Serratia grimesii* and *Serratia proteamaculans*. *Arch Microbiol* **197**:481–488.
 370. **Troxell B, Hassan HM.** 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:59.